**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Relações entre a análise multiespectral e o potencial fisiológico de sementes
de soja**

Fabiano França da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2021**

Fabiano França da Silva
Engenheiro Agrônomo

Relações entre a análise multiespectral e o potencial fisiológico de sementes de soja
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SILVIO MOURE CICERO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Fabiano França da

Relações entre a análise multiespectral e o potencial fisiológico de sementes de soja / Fabiano França da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

74 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Eficiência do fotossistema 2. Fluorescência de clorofila 3. *Glycine max* L. Merrill 4. Sementes esverdeadas 5. Vigor I. Título

DEDICO

A Deus

Por me guiar e iluminar os caminhos pelos quais eu trilho.

Aos meus pais

Jozilene França da Silva

Eraldo Ferreira da Silva

Por todo amparo, apoio, incentivo e exemplos de honestidade e amor.

Aos meus irmãos

Antônia Eliane, Reinaldo, Josimar, José Luiz, Jose Henrique,

Jessé França (*in memoriam*) e João Victor.

Por todo amparo, apoio, incentivo e amizade.

Aos familiares, em especial

João Ferreira Rodrigues (*in memoriam*),

Juliana Costa e Ari Sérgio Barbosa e

Lucas Nunes de Lima (Bê)

Pela acolhida, amizade e sonharem junto comigo.

Aos sobrinhos

Pietro, Guilherme, Cecília, Luiz Augusto,

Pedro Lucas, Matheus, Alice, Yara e Yois.

Os quais desejo um futuro promissor e cheio de bênçãos.

Aos cunhados (as)

Taylohane, Alliny e Eduarda.

Pelos incentivos e confianças depositadas em mim.

Aos professores

M.Sc. Keloisa T. Corradini dos Santos,

M.Sc. José Eduardo dos Santos,

E todos aqueles que me ensinaram, apoiaram e incentivaram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, primeiramente, a Deus, por estar comigo em todos os momentos, iluminando e guiando-me nas horas mais difíceis.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que, por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, possibilitou minha formação acadêmica.

Ao amigo e orientador professor Dr. Silvio Moure Cicero, pela paciência, dedicação, ensinamentos, confiança, exemplo profissional e orientação concedida.

Ao meu comitê de acompanhamento, professor Dr. Francisco Guilhen Gomes Junior e Eng^a. Agr^a. Dra. Clissia Barbosa da Silva, pelas valiosas sugestões, ensinamentos e contribuições fundamentais para a conclusão desta.

Aos professores Dr. José de Barros França Neto e Dr. Paulo Mazzafera pela valiosa contribuição em minha formação e auxílios durante o desenvolvimento deste projeto.

A Eng^a. Agr^a. Ms. Helena Maria C. Pescarin Chama, pela amizade, os cafés com direito a bolo e seu apoio nas análises laboratoriais do potencial fisiológico das sementes de soja.

Ao Eng^o Agrônomo, Dr e amigo, André Dantas de Medeiros, da UFV, minha gratidão por sua disponibilidade, contribuição de conhecimento em relação as análises estatísticas.

Aos companheiros de jornada, Carlos, Livia, Michaela, Mayara, Artur, Lucas, Patrícia, Bruno, Mathias, Glória, Rafael e Abimael pela amizade e contribuições e ao Grupo de Tecnologia de Sementes da USP/Esalq pela experiência vivenciada.

Aos amigos de Lavras, Rodrigo, Mari Bianchi, Elisa e Eduardo, Claudia Labory, Aline Ferreira, Tamara e Jorge, Amanda Flausino, Adriano Dorigan e Juara Cardoso, por tanto incentivo, apoio e cumplicidade durante toda a jornada acadêmica.

Aos colaboradores do Laboratório de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Adilson, Luiz Claudio, João Jabur Filho, Davi e Hodair Banzatto Jr pelos auxílios e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e suporte financeiro (processo nº. 140279/2019-9).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela disponibilidade dos Equipamentos Multiusuários (EMUs) (processos nº. 2018/03793-5; 2018/03802-4 e 2018/03807-6) essenciais para realização desta pesquisa.

Às empresas Atto Sementes e Corteva Agriscience, pela cessão das sementes utilizadas na pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, MUITO OBRIGADO.

“E mesmo que meus passos sejam falsos,
mesmo que os meus caminhos sejam errados,
mesmo que meu jeito de levar a vida te incomoda,
eu sei quem sou e sei pelo que devo lutar.
Se você acha que meu orgulho é grande,
é porque nunca viu o tamanho da minha
FÉ!”.

Tião Carreiro

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
INTRODUÇÃO GERAL	13
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Importância econômica e potencial fisiológico de sementes de soja.....	15
1.3 Aspectos fisiológicos da degradação da clorofila	16
1.3 Implicações da presença de sementes e de grãos de soja esverdeados para o comércio	17
1.4 Detecção de sementes esverdeadas: métodos convencionais e imagens multiespectrais de fluorescência de clorofila.....	19
Referências	20
2 QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCENCIA DE CLOROFILA EM SEMENTES DE SOJA POR IMAGENS MULTIESPECTRAIS E SUA RELAÇÃO COM O POTENCIAL FISIOLÓGICO	29
Resumo	29
Abstract.....	29
2.1 Introdução	30
2.2 Material e Métodos	32
2.3 Resultados e Discussão.....	36
2.4 Conclusões.....	46
Referências	46
3 ANÁLISE DE IMAGENS MULTIESPECTRAIS NA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS DE SOJA ORIUNDAS DE SEMENTES ESVERDEADAS.	51
Resumo	51
Abstract.....	51
3.1 Introdução	52
3.2 Material e Métodos	54
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.4 Conclusões.....	69
Referências	70

RESUMO

Relações entre a análise multiespectral e o potencial fisiológico de sementes de soja

Objetivou-se verificar a viabilidade da técnica de imagens multiespectrais para a identificação de sementes esverdeadas de soja, com base nos sinais de fluorescência de clorofila (FC) e correlacionar esses sinais com o potencial fisiológico das sementes, plântulas e plantas. Este estudo foi dividido em capítulos, sendo o primeiro uma revisão sobre a importância econômica da soja, a origem das sementes e dos grãos esverdeados a partir do processo de degradação da clorofila, o efeito negativo de sementes esverdeadas de soja sobre a comercialização dos lotes e os métodos convencionais e alternativos de detecção e descarte de sementes esverdeadas de soja. No segundo capítulo, tratamentos com proporções de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, misturadas às sementes amarelas, para cada cultivar (Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO), foram submetidos à quantificação da reflectância da FC das sementes, obtida nos comprimentos de 660 nm e 730 nm, e posteriormente submetidos aos testes de germinação, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado com solução saturada, tetrazólio e análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S). Por último, no terceiro capítulo, os efeitos da mesma proporção de sementes esverdeadas em meio às sementes amarelas, em cada cultivar, foram avaliadas em relação ao vigor das plântulas e plantas, aferidos com base na emergência de plântulas, velocidade de emergência de plântulas e comprimento de plantas, além dos efeitos do esverdeamento no rendimento quântico do fotossistema II das plântulas e plantas dos dois cultivares. Para os dois cultivares avaliados, os resultados evidenciaram que o aumento dos índices de sementes esverdeadas de soja está diretamente relacionado com o aumento das reflectâncias dos sinais de FC, obtidos nos espectros de 660 nm e 730 nm; consequentemente, o potencial fisiológico das sementes foi reduzido mediante a presença de mais de 4 % de sementes esverdeadas, sendo que os níveis acima de 10 % de sementes esverdeadas correlacionaram-se negativamente com a eficiência fotossintética das plântulas e das plantas, indicando danos indesejáveis no aparato fotossintético das mesmas. Em suma, a técnica de análise da fluorescência de clorofila a partir de imagens multiespectrais mostrou-se viável e eficiente na detecção de sementes esverdeadas de soja, permitindo estabelecer relações entre sua ocorrência e os danos causados ao seu potencial fisiológico.

Palavras-chave: Eficiência do fotossistema, Fluorescência de clorofila, *Glycine max* L. Merrill, Sementes esverdeadas, Vigor

ABSTRACT

Relationships between multispectral analysis and the physiological potential of soybean seeds

The objective was to verify the viability of the multispectral imaging technique to identify green seeds of soybeans, based on the chlorophyll fluorescence (CF) signals and to correlate these signals with the physiological potential of seeds, seedlings and plants. This study was divided in chapters, the first being a review of the economic importance of soybean, the origin of seeds and green grains from the chlorophyll degradation process, the negative effect of green soybeans on the commercialization of seed lots and conventional and alternative methods of detecting and disposing green soybean seeds. In the second chapter, treatments with proportions of 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % and 14 % of green seeds, mixed with yellow seeds, for each cultivar (Desafio 8473 RSF and 96R10 IPRO), were subjected to quantification of CFs reflectance of seeds, obtained in the lengths of 660 nm and 730 nm, and later submitted to germination, electrical conductivity, accelerated aging with saturated solution of salt (AASS), tetrazolium test and computerized analysis of seedling images (Vigor-S). Finally, the third chapter evaluates the effects of the same proportion of green seeds mixed with yellow seeds, in each cultivar, in relation to the vigor of seedlings and plants, measured based on seedling emergence, seedling emergence speed and length of plants, in addition to the effects of greening on the quantum yield of photosystem II of seedlings and plants of both cultivars. For both cultivars evaluated, the results showed that the increase in green soybean seed indexes is directly related to the increase in the reflectance of the CF signals, obtained in the 660 nm and 730 nm spectra; consequently, the physiological potential of seeds was reduced by the presence of more than 4 % of green seeds, and the levels above 10 % of green seeds were negatively correlated with the photosynthetic efficiency of the seedlings and plants, indicating undesirable damage in the photosynthetic apparatus. In conclusion, the chlorophyll fluorescence analysis technique from multispectral images proved to be viable and efficient to detect green soybean seeds, allowing to establish relationships between their occurrence and the damage caused to their physiological potential.

Keywords: Photosystem efficiency, Chlorophyll fluorescence, *Glycine max* L. Merrill, Green seeds, Vigor

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Biplot dos componentes principais e matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar Desafio 8473 RSF, e fluorescências de clorofila em função dos tratamentos com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas 39
- Figura 2.** Biplot dos componentes principais e matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar 96R10 IPRO, e fluorescências de clorofila em função dos tratamentos com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas 41
- Figura 3.** Sementes de soja com níveis crescentes de clorofila retida, a partir de imagens RGB (Red-Green-Blue), de morfologia interna com as mesmas sementes observada em radiografia e sinais da fluorescência de clorofila detectado por imagens multiespectrais a 660 nm (Chl 660 nm) e 730 nm (Chl 730 nm), respectivamente. 43
- Figura 4.** Imagens RGB (Red-Green-Blue), radiográficas e multiespectrais de fluorescência da clorofila das sementes amarelas e esverdeadas de dois cultivares de soja (Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO), obtidas com espectros de 660 nm e 730 nm e das fluorescências de clorofila inicial (F_0), máxima (F_m) e do rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) de plântulas e plantas desenvolvidas a partir de sementes amarelas e esverdeadas e avaliadas nos estádios fenológicos VC, V1 e V2 61
- Figura 5.** Matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar Desafio 8473 RSF: fluorescência de clorofila em função de oito tratamentos, cada qual com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas. 63
- Figura 6.** Matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar 96R10 IPRO: fluorescência de clorofila em função de oito tratamentos, cada qual 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios dos sinais da fluorescência de clorofila por tratamento de sementes de soja, detectados a 660 nm (do VideometerLab, dado em percentuais de reflectância da luz branca) e 730 nm (do SeedReporter, dados em níveis de cinza) antes da realização dos respectivos testes de germinação (G), condutividade elétrica (CE), germinação após o envelhecimento acelerado com solução saturada (EASS), índice de vigor (Tz Vg) e viabilidade (Tz Vb) aferidos pelo teste de tetrazólio e índice de vigor (IV_Vigor.S) conforme a análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S).37

Tabela 2. Médias de fluorescência de clorofila em sementes de soja, quantificada a 660 nm (do VideometerLab) e 730 nm (do SeedReporter) antes dos testes de emergência de plântulas (E), de velocidade de emergência de plântulas (IVE), de comprimento de plantas aos 20 dias após semeadura (CP20) e de fluorescência inicial (F_0), de fluorescência máxima (F_m) e de rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v / F_m) quantificados nos estádios fenológicos VC (cotilédones completamente abertos e expandidos), V1 (unifólios completamente desenvolvidos) e V2 (primeiro trifólio desenvolvido), em função da mistura de sementes esverdeadas com sementes amarelas (sem sinais de esverdeamento)60

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de sementes e de grãos de soja no Brasil faz parte de um complexo agroindustrial que coloca o Brasil como um dos maiores produtores e exportadores mundiais da *commodity*. Apesar desse *status*, a produção nacional de sementes e de grãos de soja que se dá em maior proporção na região Centro-Oeste e, também, em outras regiões caracterizadas por um clima tropical quente, está sujeita a adversidades bióticas e abióticas que influenciam negativamente a produção.

A susceptibilidade das plantas de soja às variações de temperatura, disponibilidade hídrica, nutrição mineral, umidade, ataque de insetos-praga e doenças fúngicas, aplicação de dessecantes e outros estresse bióticos e abióticos na fase final do processo de maturação das sementes condicionam à maturação forçada e bloqueio da enzima clorofilase na degradação da clorofila das sementes, cujos tegumentos e embriões apresentam-se na cor verde permanente, defeito conhecido como “semente esverdeada”.

Sementes esverdeadas podem apresentar redução e desuniformidade na germinação, redução no vigor, desuniformidades de peso, de tamanho e de forma, além da presença das espécies reativas ao oxigênio responsáveis por promover dano oxidativo e acelerar a sua deterioração. São relatados na literatura a ocorrência de impactos negativos sobre a fenologia, crescimento e rendimento em plantas de soja oriundas de sementes esverdeadas, sendo a intensidade do prejuízo proporcional ao percentual de sementes esverdeadas presentes no lote.

A presença de grãos esverdeados de soja em lotes utilizados pela indústria alimentícia, seja para produção de farelo e também produção de óleo, resulta em depreciação de sua qualidade e oneração dos custos de produção. Para evitar tais prejuízos e para promover relações comerciais, cada país dispõe de normas próprias e procedimentos para a classificação de grãos esverdeados de soja e o percentual máximo aceitável em um lote. Enquanto no Brasil o limite máximo tolerado é de 8 % de grãos esverdeados de soja em lotes comerciais, países como Malawi, China e Austrália, os limites máximos tolerados de grãos esverdeados de soja em lotes variam de 0,1 % a 5 %. Em todo o caso, o desejável é ter zero por cento de soja esverdeada nos lotes comercializados.

Para se enquadrar nos limites tolerados da presença de sementes e de grãos esverdeados de soja e com foco na melhoria da qualidade, há necessidade da detecção e do seu descarte. A análise visual a olho nu, separação por mesa gravitacional e separação eletrônica pela cor, por exemplo, tem sido utilizados em programas internos de controle da qualidade de sementes; porém, tais providências não tem sido suficientes para a resolução do problema.

O desenvolvimento de métodos para detecção de sementes esverdeadas com auxílio da técnica de análise de imagens, a exemplo da análise de imagens multiespectrais de sinais de clorofila em sementes e plantas de soja, pode acelerar o processo e reduzir a subjetividade se comparada com os métodos manuais e convencionais já estabelecidos.

A técnica de imagens multiespectrais tem como princípio a excitação das moléculas de clorofila das sementes e das plantas a partir da utilização de iluminação LED's com comprimentos de onda na faixa de 400 nm a 1000 nm, com picos centrados em 660 nm e 730 nm que estimulam as clorofilas e os sinais de fluorescência de clorofila são capturados e transformados em imagens multiespectrais. Esta técnica tem proporcionado a análise detalhada do objeto em estudo, uma vez que avalia de modo individual sementes e plantas e obtêm-se distintas características (como a coloração, textura, clorofila, antocianina, etc) o que permite ser uma análise rápida, eficiente e não destrutiva.

Embora haja uma gama de trabalhos com ênfase na utilização de equipamentos para a detecção de sementes imaturas de várias espécies e, também, de sementes esverdeadas de soja, com base em sinais de fluorescência de clorofila, existe uma lacuna na literatura em relação à eficiência de utilização da análise de imagens multiespectrais para detecção destas sementes e, consequentemente, sua relação com o seu potencial fisiológico.

Assim, objetivou-se por meio deste trabalho avaliar se a análise de imagens multiespectrais fornece informações precisas quanto à identificação e medição da fluorescência da clorofila em sementes de soja esverdeadas e a possibilidade de relacionar essas informações com o seu potencial fisiológico.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importância econômica e potencial fisiológico de sementes de soja

A produção de sementes de soja se destaca dentro das atividades econômicas do agronegócio brasileiro. Com previsão de 10,4 milhões de toneladas de sementes a serem produzidas na safra 2020/2021, estima-se um lucro a US\$ 2,35 bilhões por ano (CARVALHO et al., 2020; BRASIL, 2021). Em relação aos grãos, na safra 2020/21, são estimadas a colheita de 135,9 milhões de toneladas, cujo lucro com exportações do complexo soja (grão, farelo e óleo) sejam de US\$ 33,7 bilhões (KIST et al., 2019; CONAB, 2021).

A expansão da produção de sementes e de grãos de soja é reflexo da combinação de investimentos em tecnologia, pesquisa e desenvolvimento, por parte de empresas produtoras (BELLUZZO et al., 2014) preocupadas tanto com a produtividade, quanto com a qualidade. Para a obtenção de sementes de soja de alta qualidade é necessário que ocorra a degradação natural da clorofila pela ação de enzimas-chave que reduzem e convertem a cor verde da semente para a cor amarela, característica da semente de soja madura no ponto de maturidade fisiológica (RANGEL et al., 2011; FRANÇA-NETO et al., 2012; 2016).

Contudo, nos campos de produção, o potencial fisiológico de sementes de soja é afetado por fatores abióticos, como a seca ou períodos de estiagem críticos (FRANÇA-NETO et al., 2005) e temperaturas superiores a 30 °C, a partir do estágio R5 (PÁDUA et al., 2009), uso de desseccantes, desbalanço nutricional do solo e sensibilidade do cultivar (MARCOS-FILHO, 2015), que induzem à maturação forçada das plantas de soja e inibem as enzimas responsáveis por degradar a clorofila das sementes nos estádios finais da maturação e, portanto, condiciona a retenção da clorofila no tegumento e no embrião, um defeito conhecido por “semente esverdeada” que se reflete em sementes de baixo potencial fisiológico (MARCOS-FILHO et al., 1986; CICERO et al., 2009; FRANÇA-NETO et al., 2012; FORTI et al., 2015; BORDIGNON et al., 2017).

Além dos fatores abióticos foram constatados problemas de esverdeamento de sementes de soja causados por fatores bióticos, incluindo doenças fitopatogênicas, como fusariose e ferrugem, ataque de percevejos (FRANÇA-NETO et al., 2012) e também pela incidência do nematoide *Meloidogyne javanica* nas plantas (FORTI et al., 2015).

A partir dos estudos supracitados, foram observadas maturação forçada, redução da largura e do tamanho das sementes e maior taxa de sementes enrugadas, resultando em desuniformidade de germinação, maior taxa de plântulas anormais, redução no tamanho de plântulas e das plantas e ocorrência de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que culminam em dano oxidativo e aumento da sensibilidade das sementes à deterioração (VERTUCCI;

LEOPOLD, 1987; JALINK et al., 1999). Nessas circunstâncias, quanto mais esverdeada a semente, maior o teor de clorofila não degradada e menor o seu potencial fisiológico (JALINK et al., 1998; CICERO et al., 2009; ONYILAGHA et al., 2011; NAKAJIMA et al., 2012). Isso explica a tolerância de até 10% de sementes esverdeadas de soja no Brasil, segundo o qual não há perdas expressivas da qualidade das sementes (SINNECKER et al., 2002; PÁDUA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2016).

1.2 Aspectos fisiológicos da degradação da clorofila

Com o avanço do processo de maturação das vagens e das sementes e senescência das plantas, um processo intitulado desverdização contribui para a degradação da clorofila, de modo a remobilizar nutrientes e a biossíntese de vitaminas essenciais para o desenvolvimento de embriões e amarelecimento das folhas, vagens e tegumento das sementes (CHRIST; HÖRTENSTEINER, 2014; MARCOS-FILHO, 2015; VOM DORP et al., 2015).

A partir da clonagem e análise da função de genes catabólitos de clorofila constatou-se que a principal rota de degradação de clorofila é a via bioquímica, a partir da qual participa a feoforbídeo *a* oxigenase (PaO), com um papel importante na sua degradação (ZHU et al., 2017). Com o avanço da maturação das sementes, a clorofila *b* (*Chl b*) é degradada e convertida em clorofila *a* (*Chl a*) pelas enzimas *Chl b* redutase e 7-hidroximetil *Chl a* redutase (TANAKA; TANAKA, 2007; MEGURO et al., 2011). A partir da remoção do magnésio pela enzima magnésio-dequelatase, a *Chl a* é convertida em feofitina *a*, codificada pelos genes de cotilédones verdes de Mendel “não amareladas/verde permanente” (WU et al., 2016; ZHU et al., 2017). Posteriormente, a feofitina *a* é hidrolisada pela feofinase e produz o feoforbídeo *a* e o fitol (REN et al., 2010). A partir da clivagem do anel oxidativo de porfirina de feoforbídeo *a* pela PaO, catabólitos de clorofila verde são convertidos em catabólitos de clorofila vermelha e, posteriormente, catalisado pela redutase da via dependente da ferrodopina, gerando o catabólito fluorescente primário, que por sua vez é modificado e transportado para o vacúolo, onde o pH ácido promove conversão química do catabólito fluorescente em catabólitos não fluorescentes de clorofila (CHRIST et al., 2013; HAUENSTEIN et al., 2016; ZHU et al., 2017). Com isso, ocorre mudança da localização das duplas ligações que resulta na perda de fluorescência.

O processo de degradação da clorofila é ativo e progressivo, desencadeado não apenas por aspectos bioquímicos, mas também por distintos fatores ambientais, que regulam e sinalizam fitormônios, a exemplo do etileno, que atua na regulação transcricional dos genes catabólitos de clorofila promovendo a “desverdização” e o ABA mediando a degradação da clorofila pelo gene ABI3 durante a maturação da semente (LI et al., 2013; YIN et al., 2016;

GAO et al., 2016; MAO et al., 2017). Ressalta-se que a sinalização dos fitormônios são conhecidos como reguladores do desverdecimento em plantas sujeitas a estresses abióticos (SANCHEZ et al., 2011).

Quando da ocorrência de mutações nas enzimas de degradação da clorofila, determinados mutantes poderão exibir fenótipo verde permanente e outros sintomas fisiológicos, a exemplo do mutante *pao*, que tem defeito no PaO e acumula o feoforbídeo *a*, resultando em morte celular grave (PRUZINSKA et al., 2003; TANAKA et al., 2003; HIRASHIMA et al., 2009). Os mutantes com ausência de clorofila *b* redutase também apresentam fenótipo de permanência verde (NAKAJIMA et al., 2012).

Em soja, a ocorrência do esverdeamento das sementes foi associada à ação de genes recessivos (YOUNG; ROOS, 1978), à alteração de respostas de senescência pelos genes *d1d2*, *Gd1d2* e *Cyt* (GUIAMÉT et al., 1990) e à retenção por mutantes duplo-recessivo (*d1d1d2d2*) e citoplasmático (*CytG1*) (CHÃO et al., 1995), acarretando na retenção permanente de clorofila na semente de soja, com redução na sua germinação e no seu vigor (COSTA et al., 2001).

Em detrimento dos efeitos negativos da soja esverdeada, seja para semente ou para grãos, determinados países estabeleceram percentuais máximos de tolerância para a presença de soja esverdeada para fins comerciais; para tanto, cada país adota sanções quanto a presença de soja esverdeada, seja para o comércio interno e ou externo (SINNECKER et al., 2002; PÁDUA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2016).

1.3 Implicações da presença de sementes e de grãos de soja esverdeados para o comércio

A ocorrência de estresses bióticos e abióticos que incidem sobre a produção de sementes e de grãos de soja refletem elevados índices de materiais esverdeados dentro de lotes (MANDARINO, 2005). Além de afetar negativamente a produtividade, os referidos materiais limitam a rentabilidade dos agricultores e empresas produtoras de sementes, em nível nacional e internacional. O problema é mais crítico visto que no mercado de importação e exportação o pagamento da *commodity* soja é realizado antes mesmo da colheita, sendo no Brasil negociada pela Bolsa de Mercadorias & Futuros (BM&F).

Para promover relações de comercialização da soja entre produtores e compradores, as unidades da federação, locais e mundiais, desenvolveram normas próprias e procedimentos padronizados para classificação, formação de preços dos lotes e os deságios para os lotes cuja presença de sementes e de grãos esverdeados estiverem acima dos limites tolerados. Enquanto no Brasil a Instrução Normativa nº 11, de 15 de maio de 2007 estabelece o limite máximo

tolerado de 8 % de grãos esverdeados em lotes comerciais (BRASIL, 2007), em outros países os limites variam de 0 % a 5 %, é o caso dos limites de 0,1 % a 0,5 % em Malawi (MALAWI STANDARD, 2016), 1 % a 2 % na China, Ontario e Cansas (BOHNER, 2003) e 2 % (soja para farelo) a 5 % (soja para esmagamento) na Austrália (AOF, 2018).

Os percentuais definidos por cada país são usados para confirmar o Padrão Comercial da Soja adquirido mas, conforme o tipo de contrato de compra e venda, os valores podem variar e, nesse caso, o vendedor deve ser informado dos padrões encontrados (BRASIL, 2007). Se a qualidade dos lotes exigida por cada país estiver em conformidade a carga é aceita sem a necessidade de modificações contratuais de compra e venda. Entretanto, se os limites de tolerância para soja esverdeada estiverem em proporções acima da estabelecida pelo país comprador as cargas estarão sujeitas à aplicação de descontos proporcionais (deságios) e até a possível rejeição das cargas (BOHNER, 2003; FRANÇA-NETO et al., 2012).

Em relação as sanções, sabe-se que em Ontario foi estabelecido rejeição das cargas de soja destinadas a trituração ou desconto de até U\$ 80,00/tonelada se o destino da soja não fosse para trituração (RON LAKEY, 2002). A Austrália determinou a aplicação de 0,5 % de desconto para cada 1 % de soja esverdeada acima do máximo tolerado e havendo mais de 10 % de soja esverdeada na amostra toda a carga é rejeitada. No Brasil, produtores do Mato Grosso do Sul entregaram cargas de grãos de soja para o armazém contendo 20 % de soja esverdeada, o que resultou no desconto de 10 % do volume entregue, isto é, R\$ 160,00 por hectare produzido (PATRONI, 2009). No Paraná, a Cooperativa Castrolanda estabeleceu a aplicação de desconto sobre o peso da carga em 1 por 1, isto é, se a carga de soja apresentar mais 9,5 % de grão esverdeado em um lote cujo percentual máximo tolerado seja 8 %, será aplicado o desconto de 1,5 % (COOP, 2016). A aplicação de deságios se deve a retenção da clorofila condiciona redução no teor de óleo e rendimento de isolados proteicos, elevação da acidez dos subprodutos e consequentemente eleva o custo de refino do óleo (MANDARINO, 2005).

Estima-se que estejam sendo perdidas por ano mais de 16 milhões de toneladas de sementes e de grãos de soja, um prejuízo médio de R\$ 20 bilhões em decorrência das condições climáticas desfavoráveis (CARVALHO, 2019). No entanto, o Brasil não dispõe de regulamentação para classificação de grãos e descontos de soja nos contratos dos produtores, como já é estabelecido nos Estados Unidos, onde os descontos são referenciais ao destino da soja, seja para alimentação imediata, rações e exportação (USDA, 2013).

O procedimento adotado no Brasil que tem gerado conflito entre produtores e *tradings* é que a análise da qualidade da soja comercializada ocorre pela aferição do peso bruto comercial no ato da pesagem em balança, isto significa que para o cálculo do teor de soja esverdeada

também estão sendo consideradas as impurezas, teor de água, grãos ardidos e avariados. Isso implica na superestimação do índice de soja esverdeada e a consequente aplicação dos deságios fixado em contrato firmado entre as partes, cujos descontos serão dados na massa do lote de sementes e de grãos feita no ato do descarregamento.

O problema supracitado decorre do fato da falta de exigência de homologação e fiscalização dos resultados dos classificadores das receptoras (*tradings*) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o que gera conflitos legais entre as próprias *tradings* com os produtores e cerealistas em relação aos resultados das análises de amostras da soja e respectivos valores pagos pela carga (APROSOJA, 2013; 2018).

Alternativamente, ressalta-se a atenção de ambas partes em relação ao teor dos contratos, especificamente na clareza das taxas de serviços de limpeza e de secagem, preço pago pela carga, clareza no cálculo de desconto e os percentuais de tolerância para defeitos e avarias especificados pela empresa compradora da carga (HARA et al., 2019). Um mecanismo alternativo no sentido de promover melhoria dos lotes de sementes e grãos de soja isentos do defeito “esverdeado” e reduzir conflitos comerciais, está na utilização de metodologia mais eficiente de detecção da soja esverdeada e sua separação dos materiais aptos à comercialização.

1.4 Detecção de sementes esverdeadas: métodos convencionais e imagens multiespectrais de fluorescência de clorofila

No Brasil, a detecção de sementes esverdeadas de soja em lotes tem sido realizada a partir da observação a olho nu do grau de esverdeamento das sementes (maior ou menor quantidade de clorofila não degradada). Sobre o referido procedimento, Andrade et al. (2016) descreveram ser subjetivo, lento, de eficiência limitada e dispendioso pelo grande número de lotes a serem avaliados, o que compromete a acuidade do analista. Essas limitações, conduzem a necessidade de um método viável e não destrutivo, capaz de separar com precisão as sementes esverdeadas das sementes amarelas de soja, presentes em um mesmo lote.

A técnica de análise multiespectral de fluorescência de clorofila (FC) se baseia nas propriedades fluorescentes intrínsecas, a partir de iluminações LEDs ou laser, combinadas com banda óptica de filtros estreitos, câmeras CCDs com diferentes filtros, fotodiodo emissor de luz (660 a 730 nm) e detecção sensível à fase (amplificador *lock-in*) (JALINK et al., 1998; OOMS; DESTAIN, 2011; WANG et al., 2018). Entre 660 e 670 nm, os fotodiodos na faixa do vermelho, sob rápida emissão de pulsos (μ s), excitam as moléculas de clorofila que absorvem a energia luminosa e alcança a fluorescência máxima (F_m). Ao retornar ao seu estado fundamental, por fotossíntese ou dissipação de calor, libera energia (fluorescência), cujos sinais de fluorescência

máxima (F_m), fluorescência variável no estado escuro (F_v) e o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) são capturados a 730 nm e processados em *softwares* multiespectrais (JALINK et al., 1999; JALINK; VAN DER SCHOOR, 2011).

Dentre as vantagens da análise multiespectral de fluorescência da clorofila, destaca-se a possibilidade de relação dos resultados dos sinais de fluorescência com o potencial fisiológico das sementes, como demonstrado em *Brassica oleracea* (JALINK et al., 1998; YADAV et al., 2015), soja (CICERO et al., 2009), *Arabidopsis* (NAKAJIMA et al., 2012), coentro (GÓRNIK et al., 2013), melão (WILSON et al., 2014), arroz (HAY et al., 2015), espinafre (OLESEN et al., 2011) e tomate (LI et al., 2016). Nesses estudos, em função do teor de clorofila presente na semente houve uma resposta inversamente proporcional ao desempenho das sementes, ou seja, sementes com maiores FC e retenção de clorofila, apresentaram menor germinação.

Além de permitir acompanhar a degradação da clorofila nas sementes, outra vantagem da análise de imagens multiespectrais de FC envolve a possibilidade de analisar a atividade fotossintética potencial e real, conforme descreveram Bauriegel et al. (2011) analisando folhas e espigas de trigo. Ainda, a partir de imagens multiespectrais, Yendrek et al. (2017) determinaram a eficiência fotossintética, distribuição e variação da fluorescência de clorofila em folhas de diferentes genótipos de milho.

Enquanto para sementes a relação entre a fluorescência de clorofila e o potencial fisiológico são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior o sinal de FC, menor o percentual de plântulas normais e maior a taxa de sementes deterioradas, para plantas, essa relação é direta, ou seja, quanto maior o sinal de FC, maior a eficiência fotossintética (JALINK et al., 1999; CICERO et al., 2009; JALINK; VAN DER SCHOOR, 2011).

Diante do exposto, a análise multiespectral de FC se destaca como um método sensível, rápido, não destrutivo e eficiente na avaliação e classificação de sementes com retenção de clorofila e determinação da eficiência fotossintética de diversas espécies de plantas. Entretanto, apesar das vantagens em relação aos testes convencionais, faz-se necessário verificar se os padrões ópticos obtidos a partir da técnica de análise da FC, utilizando equipamentos multiespectrais, fornecem informações precisas e que possam relacioná-las com o potencial fisiológico das sementes de soja.

Referências

ANDRADE, D. B.; OLIVEIRA, A. S.; PINTO, C. A. G.; PIRES, R. M. O.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, M. A.; CARVALHO, M. L. M. Detection of green seeds in soybean lots by the

- Seed Analysis System (SAS). **International Journal of Current Research**, v.8, n.2, p.26462-26465, 2016.
- AOF - Australian Oilseeds Federation Incorporated. Section 1: Quality standards, technical information and typical analysis – 2018/19. **Australian Oilseeds Federation**, v.17, 2018.
- APROSOJA - Associação dos Produtores de Soja e Milho do Estado de Mato Grosso. **Brasil não possui regulamentação para classificação de grãos**. Publicado em 04 de set. 2013. Disponível em: <http://www.guaranoticias.com.br/noticias/ler/id/16392/>. Acesso em: 15 de ago. 2021.
- APROSOJA - Associação dos Produtores de Soja e Milho do Estado de Mato Grosso. **Aprosoja Brasil defende novas regras para classificação de grãos**. Publicado em 31 de jan. 2018. Disponível em: <https://canalrural.uol.com.br/sites-e-especiais/projeto-soja-brasil/aprosoja-brasil-defende-novas-regras-para-classificacao-de-graos/>. Acesso em: 15 de ago. 2021.
- BAURIEGEL, E.; GIEBEL, A.; HERPPICH, W. B. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse the impact of *Fusarium culmorum* on the photosynthetic integrity of infected wheat ears. **Sensors**, v.11, p.3965-3779, 2011.
- BELLUZZO, L. G; FRISCHTAK, C. R; LAPLANE, M. **Produção de commodities e desenvolvimento econômico**. Campinas: UNICAMP, p.9-21, 2014.
- BOHNER, H. **Green Soybeans**. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario, 2003. Disponível em: http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct_1102a2.htm. Acesso em: 15 de ago. 2021.
- BORDIGNON, B. C. S.; VEIGA, V. V.; BIANCHINI, F.; SHIMOIA, E. P. Percentual de sementes esverdeadas e sua influência na qualidade fisiológica de doze cultivares de soja. **Perspectiva**, v.41, n.155, p.25-33, 2017.
- BRASIL. **Controle da Produção de Sementes e Mudanças**: Indicadores. SIGEF/MAPA, Brasília, 2021. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/sigefsementes/index.htm>>. Acesso em: 15 de ago. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 11, de 15 de maio de 2007. Estabelece o Regulamento Técnico da Soja, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, a amostragem e a marcação ou rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n.93, p.13-15, 2007. Seção 1.

- CARVALHO, C.; KIST, B. B.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro da Soja**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2020. 92p.
- CARVALHO, M. P. **Brasil tem posição favorável no mercado mundial de grãos, dizem especialistas**. 2019. Disponível em: <http://br.rfi.fr/brasil/20190206-brasil-tem-posicao-favoravel-mundialmente-em-varias-culturas-agricolas-dizem-especialistas>. Acesso em: 20 de fev. 2020.
- CHAO, W. S.; LIU, V.; THOMSON, W. W.; PLATT, K.; WALLING, L. L. The impact of chlorophyll-retention mutations, d1d2 and cyt-G1, during embryogeny in soybean. **Plant Physiology**, v.107, n.1, p.253-261, 1995.
- CHRIST, B.; HÖRTENSTEINER, S. Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. **Journal Plant Growth Regulation**, v.33, p.4–20, 2014.
- CHRIST, B.; SÜSSENBACHER, I.; MOSER, S.; BICHSEL, N.; EGERT, A.; MÜLLER, T.; KRÄUTLER, B.; HÖRTENSTEINER, S. Cytochrome P450 CYP89A9 is involved in the formation of major chlorophyll catabolites during leaf senescence in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.25, p.1868–1880, 2013.
- CICERO, S. M.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Use of chlorophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.145-151, 2009.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2020/21**. Brasília: Conab, v.8, n.11, 2021.
- COOP – Cooperativa Castrolandia. Circular Especial de Safra – 2015/2016. Publicação Semestral da Cooperativa Castrolandia. **Informativo 5**, 2016.
- COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.102-107, 2001.
- FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; INOMOTO, M. M.; SLIWINSKA, E.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. *Meloidogyne javanica* infection of soybean plants: plant response, seed quality and green seeds occurrence. **Seed Science and Technology**, v.43, p.1-12, 2015.
- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PÁDUA, G. P.; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82p. (Embrapa Soja. Documentos, 380)
- FRANÇA-NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M.; HENNING, A. A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o**

- desempenho fisiológico – serie sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 16p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 91).
- FRANÇA-NETO J.B.; PÁDUA G.P.; CARVALHO M.L.M.; COSTA, O.; BRUMATTI, P.S.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; SANCHES, D.P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. (Embrapa Soja. Circular técnica, 38). 8p.
- GAO, S.; GAO, J.; ZHU, X.; SONG, Y.; LI, Z.; REN, G.; ZHOU, X.; KUAI, B. ABF2, ABF3, and ABF4 promote ABA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes and senescence-associated genes in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v.9, n.9, p.1272–1285, 2016.
- GÓRNIK K., JANAS R., GRZESIK M. Fluorescencja chlorofilu miernikiem dojrzalosci nasion kolendry siewnej. **Episteme**, v.20, n.1, p.317–322, 2013.
- GUIAMÉT, J. J.; TEERI, J. A.; NOODÉN, L. D. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. **Plant Cell Physiology**, v.31, p.1123-1130, 1990.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, p.591–592, 1983.
- HARA, T.; GONEI, A. L. D.; CANEPPELE, M. A. B.; CANEPPELE, C. **Projeto classificação de grãos**. 2ª ed. Aprosoja, 2019. 24p.
- HAUENSTEIN, M.; CHRIST, B.; DAS, A.; AUBRY, S.; HÖRTENSTEINER, S. A role for TIC55 as a hydroxylase of phyllobilins, the products of chlorophyll breakdown during plant senescence. **Plant Cell**, v.28, p.2510–2527, 2016.
- HAY, F. R.; TIMPLE, S.; DUIJN, B. V. Can chlorophyll fluorescence be used to determine the optimal time to harvest rice seeds for long-term genebank storage? **Seed Science Research**, v.25, p.321–334, 2015.
- HIRASHIMA, M.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide a in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v.50, p.719-729, 2003.
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R. LED induced chlorophyll fluorescence transient imager for measurements of health and stress status of whole plants. **Acta Horticulturae**, v.893, p.307-315, 2011.

- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; BIRNBAUM, Y. E.; BINO, R. J. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, v.504, p.219-22, 1999.
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; FRANDAS, A.; VAN PIJLEN, J. G.; BINO, R. J. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, v.8, p.437-443, 1998.
- KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; Beling, R. R. **Anuário Brasileiro de Sementes**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019. 56p.
- LI, C.; WANG, X.; MENG, Z. Tomato seeds maturity detection system based on chlorophyll fluorescence. **Optical Design and Testing VII**, v.10021, p.1-7, 2016.
- LI, Z.; PENG, J.; WEN, X.; GUO, H. Ethylene-Insensitive is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.25, p.3311–3328, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.
- MALAWI STANDARD. **Soybeans specification**. 2 ed. Draft Malawi Standard 244, 2016.
- MANDARINO, J.M.G. Coloração esverdeada nos grãos e seus derivados. Londrina: Embrapa Soja, **Comunicado Técnico 77**, 2005.
- MAO, C.; LU, S.; LV, B.; ZHANG, B.; SHEN, J.; HE, J.; LUO, L.; XI, D.; CHEN, X.; MING, F. A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis. **Plant Physiology**, v.174, p.1747–1763, 2017.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2.ed. Londrina: ABRATES, 2015.
- MARCOS-FILHO, J.; CARVALHO, R. V.; CICERO, S. M.; DEMÉTRIO, C. G. B. Qualidade fisiológica e comportamento de sementes de soja (*Glycine max* (L.) merrill) no armazenamento e no campo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v.43, n.2, p.389-443, 1986.
- MEGURO, M.; ITO, H.; TAKABAYASHI, A.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.23, p.3442–3453, 2011.
- NAKAJIMA, S.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll *b* reductase plays an essential role in maturation and storability of *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, v.160, p.261–273, 2012.

- OLESEN, M. H.; CARSTENSEN, J. M.; BOELT, B. Multispectral imaging as a potential tool for seed health testing of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Seed Science and Technology**, v.39, p.140-150, 2011.
- OLESEN, M. H.; NIKNESHAN, P.; SHRESTHA, S.; TADAYYON, A.; DELEURAN, L. C.; BOELT, B.; GISLUM, R. Viability prediction of *Ricinus cummunis* L. seeds using multiespectral imaging. **Sensors**, v.15, p.4592–4604, 2015.
- OOMS, D.; DESTAIN, M. F. Evaluation of chicory seeds maturity by chlorophyll fluorescence imaging. **Biosystems Engineering**, v.110, p.168-177, 2011.
- ONYILAGHA, J. C., ELLIOTT, B. H.; BUCKNER, E., OKIROR, S.O., RANEY, P. J. Seed chlorophyll influences vigor in oilseed rape (*Brassica napus* L.var AC Excel.). **Journal of Agricultural Science**, v.3, n.2, p.73-79, 2011.
- PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M.; FRANÇA-NETO, J. B.; GUERREIRO, M. C.; GUIMARÃES, R. M. Response of soybean genotypes to the expression of green seed under temperature and water stresses. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, p.140–149, 2009.
- PÁDUA G. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; CARVALHO, M. L. M.; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.112–20, 2007.
- PATRONI, L. Grãos de soja esverdeados preocupam produtores em MS. **Canal Rural**, 2009. Disponível em: <https://canalrural.uol.com.br/noticias/graos-soja-esverdeados-preocupam-produtores-47112/>. Acesso em: 20 de fev 2020.
- PRUZINSKA, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HORTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.15259-15264, 2003.
- RANGEL, M. A. S.; MINUZZI, A.; PIEREZAN, L.; TEODÓSIO, T. K. C.; ONO, F. B.; CARDOSO, P. C. Presença e qualidade de sementes esverdeadas de soja na região sul do estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.33, n.1, p.127-132, 2011.
- REN, G.; ZHOU, Q.; WU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; HUANG, J.; SUN, Z.; KUAI, B. Reverse Genetic identification of CRN1 and its distinctive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n.5, p.496-504, 2010.
- SANCHEZ, A.; SHIN, J.; DAVIS, S. J. Abiotic stress and the plant circadian clock. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, n.2, p.223–231, 2011.

- SINNECKER, P.; GOMES, M. S. O.; ARÊAS, J. A. G.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3961-3966, 2002.
- TANAKA, R.; HIRASHIMA, M.; SATOH, S.; TANAKA, A. The Arabidopsis-accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: inhibition of the pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the "stay-green" phenotype in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.1266-1274, 2003.
- TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.321-346, 2007.
- TEIXEIRA, R. N.; LIGTERINK, W.; FRANÇA-NETO, J. B.; MILHORST, H. W. M.; SILVA, E. A. Gene expression profiling of the green seed problem in soybean. **BMC Plant Biology**, v.16, n.1, p.1-15, 2016.
- TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C. **Anuário brasileiro da soja 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 104p.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Grain Inspection - Handbook Book II: Grain Grading Procedures**. Chapter 10 – soybeans. USDA, Washington, D.C., 2013.
- VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, A. C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, v.84, n.4, p.1038-1043, 1987.
- VOM DORP, K.; HÖLZL, G.; PLOHMANN, C.; EISENHUT, M.; ABRAHAM, M.; WEBER, A. P. M.; HANSON, A.; DÖRMANN, P. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.27, p.2846–2859, 2015.
- WANG, H.; XIANGJIE, Q.; ZHANG, L.; XU, S.; LI, H.; XIA, X.; DAI, L.; XU, L.; YU, J.; LIU, X. A method of high throughput monitoring crop physiology using chlorophyll fluorescence and multispectral imaging. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1-12, 2018.
- WILSON, H. T.; KHAN, O.; WELBAUM, G. E. Chlorophyll fluorescence in developing 'Top Mark' Cantaloupe (*Cucumis melo*) seeds as an indicator of quality. **Seed Technology**, v.36, n.2, 2014.
- WU, S.; LI, Z.; YANG, L.; XIE, Z.; CHEN, J.; ZHANG, W.; LIU, T.; GAO, S.; GAO, J.; ZHU, Y.; XIN, J.; REN, G.; KUAI, B. NON-YELLOWING2 (NYE2), a close paralog of NYE1, plays a positive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v.9, p.624–627, 2016.

- YADAV, S. K.; JALINK, H.; GROOT, S. P. C.; VAN DER SCHOOR, R. YADAV, S.; MADLANI, M.; KODDLE, J. Quality improvement of aged cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) seeds using chlorophyll fluorescence sensor. **Scientia Horticulturae**, v.189, p.81–85, 2015.
- YENDREK, C. R.; TOMAZ, T.; MONTES, C. M.; CAO, Y.; MORSE, A. M.; BROWN, P. J.; MCINTYRE, L. M.; LEAKEY, A. D.; AINSWORTH, E. A. High-throughput phenotyping of maize leaf physiological and biochemical traits using hyperspectral reflectance. **Plant Physiology**, v.173, p.614–626, 2017.
- YIN, X. R.; XIE, X. L.; XIA, X. J.; YU, J. Q.; FERGUSON, I. B.; GIOVANNONI, J. J.; CHEN, K. S. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. **Plant Journal**, v.86, n.5, p.403–412, 2016.
- YOUNG, L. D.; ROSS, J. P. Resistance evaluation and inheritance of a nonchlorotic response to brown spot of soybean. **Crop Science**, v.18, p.1075-1077, 1978.
- ZHU, X.; CHEN, J.; QIU, K.; KUAI, B. Phytohormone and light regulation of chlorophyll degradation. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-8, 2017.

|

2 QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA EM SEMENTES DE SOJA POR IMAGENS MULTIESPECTRAIS E SUA RELAÇÃO COM O POTENCIAL FISIOLÓGICO

Resumo

Sementes esverdeadas de soja, decorrentes de estresses bióticos e abióticos, apresentam menor potencial fisiológico. A análise de sementes esverdeadas de soja tem sido realizada, rotineiramente a olho nu; tal análise é demorada, cansativa e imprecisa. Assim, a técnica de análise de imagens multiespectrais para detecção da fluorescência de clorofila (FC) em sementes de soja foi estudada com o objetivo de avaliar a relação entre os sinais da FC e o seu potencial fisiológico. Para dois cultivares, Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO, foram compostos oito tratamentos correspondendo a 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas que, em seguida, foram submetidos a diferentes testes de qualidade. Inicialmente, detectou-se a FC dos tratamentos utilizando espectros de 660 nm e 730 nm e, utilizando as mesmas sementes, procedeu-se aos testes de germinação, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl, teste de tetrazólio e análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada tratamento. Com o *software* R®, os dados dos testes de germinação, de vigor e de FC das sementes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) foram calculados para todas as combinações entre as avaliações com significância dos valores r , determinados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e procedeu-se a análise multivariada de componentes principais. Os resultados indicaram que a técnica de análise de imagens multiespectrais é eficiente para a identificação das sementes esverdeadas e a quantificação de sua fluorescência de clorofila. As sementes esverdeadas dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO apresentaram índices de fluorescência de clorofila maiores do que 40 pontos (a 660 nm) e maior do que 5.000 pontos (a 730 nm). Ocorreu correlação negativa entre o percentual de sementes esverdeadas de soja e a qualidade fisiológica das sementes, de modo que amostras com mais de 4 % de sementes esverdeadas provocaram perdas acentuadas no seu potencial fisiológico. Portanto, a fluorescência de clorofila, detectada por intermédio de imagens multiespectrais, é um indicativo do potencial fisiológico de sementes de soja.

Palavras-chave: Espectroscopia; *Glycine max* L. Merrill; Retenção de clorofila; Sementes esverdeadas; Vigor de sementes.

QUANTIFICATION OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN SOYBEAN SEEDS BY MULTISPECTRAL IMAGES AND THEIR RELATIONSHIP WITH PHYSIOLOGICAL POTENTIAL

Abstract

Green seeds of soybean, resulting from biotic and abiotic stresses, have low physiological potential. The analysis of green seeds of soybean has been performed routinely by the naked eye; such analysis is time consuming, tiring and imprecise. Thus, the multispectral image analysis technique to detect chlorophyll fluorescence (CF) in soybean seeds was studied in order to assess the relationship between CF signals and the physiological potential. For two cultivars, Desafio 8473 RSF and 96R10 IPRO, eight treatments were composed corresponding

to 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12% and 14% of greenish seeds, which were then submitted to different quality tests. Initially, the CF of treatments was detected using spectra of 660 nm and 730 nm and, using the same seeds, the germination test, electrical conductivity, accelerated aging with saturated NaCl solution, tetrazolium test and computerized analysis of seedling images (Vigor-S), were carried out. A completely randomized design was used, with four replicates of each treatment. Using R[®] software, the data from germination, vigor and CF tests were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means grouped by the Skott-Knott test ($p \leq 0.05$). Pearson's linear correlation coefficients (r) were calculated for all combinations among evaluations with significance of the r -values, determined by the t test ($p \leq 0.05$) and multivariate analysis of main components was performed. The results indicated that the analysis of multispectral images with multivariate statistics are efficient to identify green seeds and quantify their chlorophyll fluorescence. The green seeds of Desafio 8473 RSF and 96R10 IPRO cultivars showed chlorophyll fluorescence indices greater than 40 points (at 660 nm) and greater than 5.000 points (at 730 nm). There was a negative correlation between the percentage of green soybean seeds and the physiological quality of seeds, so that samples with more than 4 % of green seeds caused sharp losses in their physiological potential. Therefore, the chlorophyll fluorescence, detected through multispectral images, is an indication of the physiological potential of soybean seeds.

Keywords: Spectroscopy; *Glycine max* L. Merrill; Chlorophyll retention; Greenish seeds; Seed vigor.

2.1 Introdução

No Brasil, a soja (*Glycine max* L. Merrill) é a espécie mais cultivada, com 10,44 milhões de toneladas de sementes produzidas em 2,45 milhões de hectares, na safra 2020/2021 (BRASIL, 2021) e 135,9 milhões de toneladas de grãos produzidos em 38,5 milhões de hectares, na safra 2020/2021 (CONAB, 2021). Por ser uma espécie suscetível e sensível à estresses ambientais, tem sido observados índices elevados de soja esverdeada nos lotes de sementes e dos grãos colhidos, cuja qualidade é expressivamente menor em comparação com a soja com coloração característica do cultivar e sua presença compromete a comercialização tanto das sementes como dos grãos.

As sementes esverdeadas de soja ocorrem no final da maturação das sementes, quando, por exemplo, temperaturas acima de 30 °C, déficit hídrico, ataque de percevejos, ferrugem asiática, nematoides e dessecantes, isolados ou em conjunto, induzem reações fisiológicas que culminam com a maturação forçada e inibição das enzimas como a feoforbideo a oxigenase e clorofila vermelho catabolito redutase. Como resultado da inibição dessas enzimas, a clorofila fica retida no tegumento e embrião das sementes e estas, por sua vez, apresentam-se com tonalidade esverdeada (FRANÇA-NETO et al., 2012; FORTI et al., 2015; MARCOS-FILHO et al., 2015; BORDIGNON et al., 2017).

Por apresentam EROs, sementes de soja esverdeadas apresentam deterioração mais acentuada e tem seu potencial fisiológico drasticamente afetado, a exemplo da redução e

desuniformidade na germinação, redução no vigor, baixo desenvolvimento radicular, anormalidade de plântulas e alterações na fenologia e no rendimento de sementes e de grãos (ZORATO et al., 2007; CICERO et al., 2009; RANGEL et al., 2011; FRANÇA-NETO et al., 2012; SMANIOTTO et al., 2013; FORTI et al., 2015; PARDO et al., 2015).

A análise a olho nu tem sido realizada para avaliar a presença de sementes esverdeadas de soja; por outro lado, a mesa gravitacional, a máquina eletrônica de separação pela cor e a eliminação de sementes menores (muitas sementes esverdeadas de soja apresentam tamanho inferior em relação às sementes amarelas), têm sido utilizadas com o objetivo de separar e descartar sementes esverdeadas presentes em lotes de sementes. Entretanto, a análise a olho nu é demorada, cansativa e imprecisa, ao passo que o descarte pelas referidas máquinas tem eficácia limitada por não conseguirem separar com precisão as sementes esverdeadas (FRANÇA-NETO et al., 2005; ANDRADE et al., 2016). A utilização de imagens multiespectrais, associadas à visão computacional, pode ser uma técnica com grande potencial de sucesso na detecção de sementes esverdeadas de soja e, conseqüentemente, possibilitar a sua eliminação com máquinas específicas para tal finalidade.

A detecção da fluorescência de clorofila (FC) das sementes, com a utilização de imagens multiespectrais, se dá pela iluminação da amostra de sementes com diodos emissores de luz (LEDs) com espectros que variam de 400 a 1000 nm, do ultravioleta (UV) ao infravermelho próximo (NIR), onde as clorofilas são excitadas a 660 nm ou 730 nm, a depender do sensor de cada equipamento multiespectral, e a refletância da amostra é registrada por sensor de imagem monocromático (CCD = charge coupled device) (MO et al., 2015; NI et al., 2019). Assim, a imagem multiespectral consiste de sub-imagens individuais, cada qual obtida em comprimento de onda específico e em escala de cinza.

Apesar da recente utilização de imagens espectrais para detecção da FC em sementes, a literatura evidencia a relação entre o estresse ambiental e a qualidade de sementes de soja avaliadas com a técnica imagem espectral (MO et al., 2015). Trabalhos com sensores de FC elucidam que a técnica de FC foi eficaz na detecção de sementes imaturas de arroz, couve, espinafre, pimentão e sementes esverdeadas de soja, tendo sido evidenciada a relação entre os sinais da FC com o potencial fisiológico das referidas sementes (JALINK et al., 1998; CICERO et al., 2009; CAIRES et al., 2010; DELEURAN et al., 2013; KENALOGU et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Uma vez que as características espectrais de cada semente é a base para detectar alterações físico-químicas decorrentes de estresses biótico e, ou abiótico, avaliou-se, no presente trabalho, a eficiência da análise de imagens multiespectrais na medição da

fluorescência de clorofila em amostras com diferentes proporções de sementes amarelas e esverdeadas de soja, além de determinar as relações entre o percentual de sementes esverdeadas, a fluorescência de clorofila e o potencial fisiológico das sementes.

2.2 Material e Métodos

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba SP.

Foram utilizadas sementes de soja, dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO, provenientes, respectivamente, das empresas Atto Sementes, localizada em Rondonópolis (MT) e Corteva Agriscience, localizada em Planaltina (DF), produzidas na safra 2018/2019. As sementes foram armazenadas em câmara fria e seca (10 °C e 30 % de umidade relativa do ar) até a realização do experimento. Como os lotes dos dois cultivares mesclavam sementes esverdeadas e amarelas (cor característica das sementes maduras dos cultivares utilizados), as sementes com quaisquer tonalidades da cor verde foram separadas das amarelas de forma visual e manual, sob lupa circular de seis aumentos.

Para a realização dos testes de germinação, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl, tetrazólio e análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S), foram utilizados para cada teste oito tratamentos constituídos pela mistura de sementes esverdeadas com as sementes amarelas (sem sinais de esverdeamento) nas proporções de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, com base da massa de sementes. Inicialmente, as sementes foram submetidas à análise radiográfica, seguida da análise multiespectral para detecção e quantificação da fluorescência de clorofila utilizando dois equipamentos multiespectrais (VideometerLabTM e SeedReporterTM) e, por fim, as mesmas sementes foram submetidas aos testes de qualidade conforme metodologias descritas a seguir.

Teste de raios X: foi realizado com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, onde as sementes de cada repetição foram identificadas e dispostas uma a uma, equidistante uma da outra, em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro. Em seguida, cada placa foi colocada individualmente dentro do aparelho de raios X digital, modelo Faxitron[®] MultiFocus (Faxitron Bioptics LLC, USA), distanciada a 20 cm da fonte de emissão de radiação, e radiografadas a 25 kV com exposição de 15 segundos. As imagens radiográficas digitais foram obtidas, salvas em HD externo, avaliadas quanto a presença de danos mecânicos, por “umidade” e por

percevejos e substituição dessas sementes por outras sem danos, de modo a minimizar a interferências destas no potencial fisiológico e isolar o efeito do esverdeamento. Em sequência, as sementes foram submetidas à detecção da fluorescência de clorofila por técnicas multiespectrais.

Deteção e quantificação da fluorescência de clorofila com o VideometerLab: antes de proceder as capturas das imagens multiespectrais, o VideometerLab4TM (Videometer A/S, Herlev, Denmark) foi calibrado quanto a intensidade de luz e correspondências de pixels, usando um alvo branco, seguido de outro alvo escuro uniforme e, finalmente, calibrado com um alvo geométrico. Para cada teste destinado à avaliação da qualidade das sementes, as placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro com as sementes, radiografadas na etapa anterior, foram individualmente posicionadas sob a esfera de integração do VideometerLab4TM, composto por 19 diodos emissores de luz (LEDs variando de 365 nm a 970 nm) contíguos, que após pulsos sucessivos permitiu a excitação das moléculas de clorofila a 630 nm, 645 nm e 660 nm, e emissão dos sinais de FC das sementes a 700 nm, cujos registros ocorreram pelo chip padrão de carga acoplada monocromática (CCD), e foram geradas 25 imagens de resolução 2192 × 2192 pixels. Após aquisição das imagens, foi identificada em cada uma as regiões de interesse (ROIs), que eram as sementes de soja, e separou-as do plano de fundo utilizando máscara ‘background’ do *software* VideometerLabTM. Utilizando a banda de 660 nm, identificou-se diferenças espectrais entre a semente esverdeada e a amarela e utilizou-se o método supervisionado nCDA (Análise Discriminante Canônica Normalizada) para a transformação de imagens multiespectrais, de modo a minimizar ou maximizar as observações dentro e entre as amostras de sementes (FRANÇA-SILVA et al., 2020). Com auxílio do “blob” (Objeto Binário Rotulado) foram extraídas as reflectâncias da FC das sementes na banda de 660 nm e os dados foram exportados para o Excel e submetidos à análise estatística para o relacionamento com o potencial fisiológico das sementes.

Deteção e quantificação da fluorescência de clorofila com o SeedReporter: para cada teste destinado à avaliação da qualidade das sementes, as sementes de cada repetição por tratamento utilizadas nas determinações anteriores (raios X e VideometerLab), foram retiradas das placas de petri e transferidas para placas de policloreto de vinilo, retangulares, de cor preta fosco, para evitar interferência no contraste das imagens, e com 100 cavidades côncavas para armazenar as sementes. As sementes foram posicionadas e numeradas na mesma ordem em que estavam nas imagens de raios X e do VideometerLab. Em seguida, cada placa contendo as

sementes foi conduzida para o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation B.V., Wageningen, Netherlands) que ao emitir subpulsos dos LEDs na faixa de 620 nm, de forma síncrona, excitaram as clorofilas e, por meio da rápida repetição da taxa fluorimétrica (FRRF), da duração dos impulsos e filtro de emissão de FC na banda de 730 nm, registrou-se imagens na escala de cinza, com resolução de 2448 x 2448 pixels. Com o auxílio do *Software* CFTI – *Analisis* (versão 5.5.1), para não comprometer o cálculo da FC, cada imagem com as sementes foi submetida à aplicação de filtro para isolar e analisar as regiões de interesse (ROIs), que eram as sementes de soja, e extraiu-se os índices da reflectância da FC das sementes na banda de 730 nm. Os dados foram exportados para o Excel e submetidos à análise estatística. As sementes foram retiradas das placas de acrílico, transferidas para bandejas de plástico com células individuais, mantendo a mesma ordem de numeração e submetidas aos respectivos testes, discriminados a seguir.

Germinação: foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento, inicialmente submetidas às análises de imagens radiográficas e multiespectrais para detecção da fluorescência da clorofila, conforme etapas descritas anteriormente. As sementes foram numeradas e distribuídas sobre papel-toalha, previamente umedecido com água, na proporção de massa de 2,5:1 (água:papel seco). Os rolos com as sementes foram levados ao germinador a 25 °C e as contagens realizadas após quatro e oito dias (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentual de plântulas normais.

Condutividade elétrica: após análise de imagens radiográficas e multiespectrais para detecção e quantificação da fluorescência de clorofila, as quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram pesadas em balança de precisão (0,01 g) e colocadas em copos de plástico de 200 mL, preenchidos com 75 mL de água deionizada. Os copos foram mantidos por 24 horas sob 25 °C (VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020). Ao final deste procedimento foi aferida a leitura da condutividade elétrica da solução, utilizando condutivímetro DIGIMED®, modelo DM-31. Os dados das leituras de cada repetição foram divididos pela massa inicial das sementes, e foram expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de sementes.

Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS): foi realizado com quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, previamente submetidas à análise de imagens radiográficas e multiespectrais para detecção e quantificação da fluorescência de clorofila. Foram utilizadas caixas de plástico transparentes (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), compondo

compartimentos individuais (minicâmaras), contendo no fundo 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g/100 mL de água) para permitir um ambiente com 76 % de umidade relativa do ar, e uma tela metálica (inox) suspensa, sobre a qual foi colocada camada única e uniforme de sementes. Após serem fechadas, as caixas foram mantidas em câmara durante 48 horas a 41 °C. Posteriormente foram semeadas, conforme metodologia descrita para o teste de germinação, com a avaliação da porcentagem de plântulas normais realizada no quinto dia após a semeadura (MARCOS-FILHO, 2020).

Tetrazólio: foi realizado com quatro repetições de 25 sementes cada por tratamento, logo após as sementes terem sido submetidas às análises de imagens radiográficas e multiespectrais para detecção da fluorescência da clorofila. As sementes foram pré-embebidas com água em papel-toalha por 16 horas, a 25 °C. Em seguida, as sementes foram colocadas em bandejas de plástico com 100 células individualizadas contendo 3 mL da solução de 0,075% de sal de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, por 150 minutos, a 35 °C, no escuro. Após o desenvolvimento da coloração, a solução foi drenada e as sementes foram lavadas três vezes em água corrente. As sementes foram seccionadas em duas partes longitudinais e classificadas conforme metodologia descrita por França-Neto et al. (2018), em que as classes de 1 a 3 são indicativos dos índices de vigor e de 1 a 5 índices de viabilidade.

Análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S): foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes por tratamento de cada cultivar, logo após a análise de imagens radiográficas e multiespectrais para detecção e quantificação da fluorescência de clorofila. As sementes foram numeradas e distribuídas sobre papel-toalha, previamente umedecido com água, na proporção de massa de 2,5:1 (água:papel seco). Os rolos com as sementes foram levados ao germinador a 25 °C (BRASIL, 2009) e no terceiro dia após a semeadura as plântulas foram submetidas à análise computadorizada de imagens utilizando o *software* Vigor-S. As plântulas foram transferidas do papel-toalha para folhas de etil vinil acetato azul, com dimensão de 30 x 22 cm, correspondentes a área útil do escâner HP Scanjet 200, instalado em posição invertida no interior de uma caixa de alumínio (60 x 50 x 12 cm), ajustado para 300 dpi e acoplado a um computador. Após o processamento das imagens, obtiveram-se os índices de vigor (valores de 0 a 1000, diretamente proporcionais ao vigor)

Delineamento experimental e análise estatística: foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento de cada cultivar (as

análises foram realizadas isoladamente para cada cultivar). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Procedeu-se a confirmação da distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett e, em seguida, agrupou as médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Foram calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) para todas as combinações entre as avaliações e determinada a significância dos valores de r pelo teste t ($p \leq 0,05$). Finalmente, foi realizada a análise dos componentes principais. Todas as análises foram feitas com o *software* R, versão 4.0.0 (R Core Team, 2019).

2.3 Resultados e Discussão

Para o cultivar Desafio 8473 RSF, embora a germinação, a condutividade elétrica e a viabilidade aferida pelo tetrazólio não tenham sido afetados pelos níveis de sementes esverdeadas, foi observado que após o envelhecimento acelerado com solução saturada a germinação das sementes do tratamentos com mais de 4 % de sementes esverdeadas foi inferior a 89 %, o vigor aferido pelo tetrazólio foi menor ou igual a 64 % nos tratamentos com 4 %, 8 % e 14 % de sementes esverdeadas e, o vigor aferido pelo *software* Vigor-S ficou abaixo de 575 pontos nos tratamentos com mais de 4 % de sementes esverdeadas (Tabela 1).

No cultivar 96R10 IPRO não houve efeitos indesejáveis do porcentual de sementes esverdeadas sobre germinação das sementes após o envelhecimento acelerado com solução saturada, viabilidade aferida no teste de tetrazólio e vigor aferido pelo Vigor-S; no entanto, a presença de mais de 10 % de sementes esverdeadas reduziram para 77 % a germinação das sementes, ao passo que os níveis de 2 %, 6 % e 14 % de sementes esverdeadas foram os mais prejudiciais para a condutividade, superando os $216 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ e, quanto ao vigor avaliado pelo teste de tetrazólio, efeitos mais expressivos foram observados para o tratamento com 6 % e 12 % de sementes esverdeadas, cujo valor de vigor observado foi de 59 (Tabela 1).

Para a variável fluorescência de clorofila (FC) das sementes, em todos os testes de qualidade das sementes, foram observadas grandes diferenças entre os tratamentos nos dois cultivares. Como se pode observar, o tratamento com 14 % de sementes esverdeadas apresentou as médias mais altas de FC, ao passo que as médias mais baixas de FC foram observadas para o tratamento sem sementes esverdeadas (0 %). No geral, o aumento de 0 % a 14 % de sementes esverdeadas, resultou em acréscimo nas reflectâncias relacionadas à FC de cada tratamento, além de que os tratamentos com índices igual ou superior a 6 % de sementes esverdeadas resultaram em reduções expressivas na sua qualidade fisiológica (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios dos sinais da fluorescência de clorofila por tratamento de sementes de soja, detectados à 660 nm (do VideometerLab, dado em percentuais de reflectância da luz branca) e 730 nm (do SeedReporter, dados em níveis de cinza) antes da realização dos respectivos testes de germinação (G), condutividade elétrica (CE), germinação após o envelhecimento acelerado com solução saturada (EASS), índice de vigor (Tz Vg) e viabilidade (Tz Vb) aferidos pelo teste de tetrazólio e índice de vigor (IV_Vigor.S) conforme a análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S).

Tratamentos	660 nm (%)	730 nm Index	G (%)	660 nm (%)	730 nm Index	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	660 nm (%)	730 nm Index	EASS (%)	660 nm (%)	730 nm Index	Tz Vg (%)	Tz Vb	660 nm (%)	730 nm Index	IV_Vigor.S ---Index---
Cultivar Desafio 8473 RSF																
0 %	38.48 d	2041.04 d	93	82.70 a	2280.59 b	126.00	77.98 a	2329.28 b	95 a	96.5 b	2097.1 b	82 a	94	95.5 c	2073.5 b	755.1 a
2 %	41.00 c	2315.11 c	85	72.04 a	2474.48 b	141.03	79.84 a	2415.89 b	89 b	96.9 b	2166.9 b	77 a	92	95.7 c	2196.3 b	642.5 a
4 %	41.81 c	2440.38 c	91	38.80 b	2392.93 b	136.63	38.08 b	2643.64 a	94 a	100.9 b	2382.7 b	64 b	81	99.4 c	2133.3 b	652.7 a
6 %	41.44 c	2367.60 c	86	39.70 b	2572.73 a	134.74	39.30 b	2584.58 a	88 b	102.6 b	2568.4 b	71 a	88	103.7 b	2395.2 b	568.4 b
8 %	42.38b	2666.59 b	88	41.31 b	2800.20 a	142.13	38.66 b	2552.19 a	89 b	106.3 a	3014.7 a	64 b	84	106.4 b	2673.5 b	570.9 b
10 %	42.74 b	2518.79 c	88	44.93 b	2476.25 b	130.13	39.14 b	2691.42 a	86 b	109.9 a	3122.3 a	72 a	86	110.3 a	2716.6 b	573.6 b
12 %	43.66 b	2750.11 b	83	45.20 b	2504.88 b	145.78	39.66 b	2672.10 a	87 b	111.7 a	3183.1 a	78 a	87	110.3 a	3327.6 a	553.9 b
14 %	45.14 a	3004.94 a	85	40.75 b	2639.87 a	131.99	40.51 b	2906.69 a	82 b	113.6 a	3390.8 a	52 b	85	112.8 a	3552.6 a	574.7 b
F.sig	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*
CV	2.24	6.31	5.13	17.81	6.8	9.73	2.75	7.12	2.75	3.6	11.1	13.48	8.2	4.3	14.5	12.1
Cultivar 96R10 IPRO																
0 %	64.43	2288.27 c	89 a	65.07 c	2306.62 b	199.19 b	83.76 b	2292.90 b	93	62.5 c	2170.1 c	95 a	98	59.7 b	2148.5 b	476.4
2 %	64.08	2319.64 c	91 a	65.57 c	2399.22 b	216.65 a	83.96 b	2397.74 b	95	65.2 c	2361.8 c	73 b	89	63.5 b	2516.0 b	444.4
4 %	64.62	2425.41 c	88 a	66.49 c	2451.37 b	210.62 b	85.63 b	2465.71 b	99	67.3 c	2426.1 c	80 a	93	64.2 b	2617.0 b	430.4
6 %	67.08	2573.63 c	85 b	67.73 b	2607.65 b	233.20 a	85.81 b	2510.07 b	98	64.8 c	2855.9 b	59 b	86	68.1 a	3127.7 a	432.3
8 %	67.04	2484.46 c	84 b	67.80 b	2566.53 b	195.30 b	87.60 a	2594.36 b	96	66.9 c	2704.4 b	90 a	95	69.3 a	3662.9 a	403.5
10 %	68.63	2843.71 b	83 b	68.43 b	2576.74 b	201.23 b	88.87 a	2699.73 a	96	68.5 c	3006.6 b	89 a	95	70.5 a	3595.8 a	443.5
12 %	68.95	2749.54 b	77 c	70.72 c	2873.05 a	207.61 b	90.51 a	2897.74 a	97	70.0 b	3211.3 b	59 b	87	69.6 a	3423.9 a	460.5
14 %	70.10	3245.68 a	77 c	71.97 c	3036.91 a	222.84 a	90.52 a	2850.34 a	96	75.4 a	4088.3 a	65 b	85	70.6 a	3651.7 a	451.4
F.sig	ns	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	ns
CV (%)	1.76	9.16	4.64	2.42	5.94	6.03	2.05	6.65	2.5	4.28	10.62	11.51	8.72	4.9	12.5	18.79

F.sig - Significância do teste F, em que ns= não significativo e * = significativo ($p < 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes nas colunas, dentro de cada cultivar, diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV – Coeficiente de variação.

A análise de componentes principais (PCA) permitiu reduzir a dimensionalidade dos dados e verificar as inter-relações entre as variáveis fluorescência de clorofila das sementes e germinação, vigor, viabilidade e teor de clorofila da massa de sementes, além de permitir a visualização de uma separação espacial das amostras dos dois cultivares.

Para explicar a variabilidade nos dados do cultivar Desafio 8473 RSF, foram necessários dois componentes, o PC1 e o PC2, que explicaram 67,40 % e 14,80 % da variabilidade, respectivamente, ou 82,20 % da variabilidade total (Figura 1a). Os tratamentos com 0 %, 2 % e 4 % de sementes esverdeadas apresentaram maior potencial fisiológico, conforme a proximidade desses tratamentos com as variáveis germinação, envelhecimento acelerado com solução saturada, índice de vigor e viabilidade pelo teste de tetrazólio e índice de vigor computado no Vigor-S, posicionados no mesmo lado no biplot (Figura 1a).

Os tratamentos com 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas exibiram proximidades com a fluorescência de clorofila, a 660 nm e 730 nm e, por sua vez, estiveram posicionadas no vetor oposto às variáveis de qualidade das sementes, o que indica redução do potencial fisiológico das sementes nesses tratamentos em função da proporção de sementes esverdeadas de soja (Figura 1a).

Os resultados da correlação r de Pearson (Figura 1b) para o cultivar Desafio 8473 RSF demonstram que, em geral, ocorreram correlações muito fortes e positivas ($r \geq 0,73$) entre os diferentes testes de qualidade, como a germinação, EASS e o vigor e a viabilidade aferidos pelo teste de tetrazólio e, de modo similar, correlações muito fortes e positivas ($r \geq 0,80$) foram observadas entre os sinais de fluorescência de clorofila, a 660 nm e 730 nm, das sementes dos respectivos testes de qualidade. Contudo, correlações muito fortes e negativas ($r \leq -0,73$) ocorreram entre a maioria dos testes de qualidade e os sinais de fluorescência de clorofila das sementes, obtidos nas bandas de 660 nm e 730 nm (Figura 1b).

Esse comportamento indica que a retenção de clorofila nas sementes é diretamente responsável por aumentar a magnitude dos sinais da fluorescência de clorofila e tem relação inversa com o potencial fisiológico das sementes, ou seja, a relação inversa entre a FC e as variáveis relativas à qualidade fisiológica das sementes indicam que quanto maior a FC das sementes, menor a germinação, o vigor e a viabilidade das mesmas.

Figura 1. Biplot dos componentes principais [a] e matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar Desafio 8473 RSF, e fluorescências de clorofila em função dos tratamentos com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas [b]. Os números na matriz mostram o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis. *, significativo ($p < 0,05$); G, germinação; CE, condutividade elétrica; EASS, germinação após o envelhecimento acelerado com solução saturada; Tz Vigor e Tz viab, índice de vigor e viabilidade pelo tetrazólio; IV_Vigor.S, índice de vigor pela análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S); 660 e 730, fluorescência de clorofila detectada a 660 nm e 730 nm.

Os resultados da análise dos componentes principais para a qualidade e fluorescência de clorofila dos oito tratamentos do cultivar 96R10 IPRO são apresentados na Figura 3. Foram encontrados dois componentes, o componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), cada qual responsável por explicar 64,70 % e 14,80 % da variabilidade dos dados ou 79,50 % da variabilidade total (Figura 2a).

Enquanto os tratamentos com 0 %, 2 %, 4 % e 8 % de sementes esverdeadas apresentaram maior potencial fisiológico, conforme a proximidade desses tratamentos com as variáveis germinação, índice de vigor e de viabilidade aferidos no teste de tetrazólio e índice de vigor computado no Vigor-S, os tratamentos com 6 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas exibiram proximidades com a condutividade elétrica, envelhecimento acelerado com solução saturada e a fluorescência de clorofila, a 660 nm e 730 nm e, por sua vez, estiveram posicionadas no vetor oposto às variáveis de qualidade das sementes, o que indica que as sementes desses tratamentos apresentaram potencial fisiológico mais baixo (Figura 2a).

Os resultados da correlação r de Pearson para o cultivar 96R10 IPRO demonstram que o índice de vigor computado no Vigor-S não apresentou correlação com quaisquer outras variáveis (Figura 2b). Correlações muito fortes e positivas ($r \geq 0,72$) ocorreram entre a viabilidade e o vigor aferidos pelo teste de tetrazólio e, de igual modo, entre todos os sinais de fluorescência de clorofila, a 660 nm e 730 nm, das sementes de todos os testes de qualidade (Figura 2b).

Por outro lado, correlações muito fortes e negativas ($r \leq -0,71$) ocorreram com a condutividade, a viabilidade e o vigor aferidos pelo teste de tetrazólio, bem como na germinação com todos os sinais de fluorescência de clorofila das sementes de todos os testes de qualidade, obtidos nas bandas de 660 nm e 730 nm (Figura 2b). Essa relação inversa da fluorescência de clorofila das sementes com a qualidade fisiológica está associada à retenção da clorofila nas sementes que limitam a síntese de fotossintatos e contribuem para a presença de EROs que intensificam a deterioração. Assim, quanto maior o nível de sementes esverdeadas mais acentuada é a redução da qualidade fisiológica das sementes.

Figura 2. Biplot dos componentes principais [a] e matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar 96R10 IPRO, e fluorescências de clorofila em função dos tratamentos com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas [b]. Os números na matriz mostram o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis. *, significativo ($p < 0,05$); G, germinação; CE, condutividade elétrica; EASS, germinação após o envelhecimento acelerado com solução saturada; Tz Vigor e Tz viab, índice de vigor e viabilidade pelo tetrazólio; IV_Vigor.S, índice de vigor pela análise computadorizada das imagens de plântulas (Vigor-S); 660 e 730, fluorescência de clorofila detectada a 660 nm e 730 nm.

Os padrões da fluorescência de clorofila das sementes foram aferidos com imagens multiespectrais e classificados conforme o nível de retenção de clorofila no tegumento e embrião (Figura 3). Para uma mesma semente, imagens em escala de cores em RGB (Red-Green-Blue), radiográfica (escala de cinza) e mapa de cores, com padrões variáveis da intensidade de refletância das sementes, na banda de 660 nm (pelo método nCDA, do VideometerLab) e 730 nm (do SeedReporter) permitiram a identificação da área da semente com clorofila retida (sementes esverdeadas).

Foi observado que quanto maior o nível de retenção da clorofila no tegumento e no embrião, maior foi a FC e menor a qualidade fisiológica das referidas sementes (Figura 3). Portanto, as sementes “amarelas” apresentaram fluorescência de clorofila indetectáveis nas imagens multiespectrais e apresentaram maior germinação e vigor (Figuras 3a e 3e). Por outro lado, sementes com sinais da FC fracos (cujas tonalidades a olho nu foram levemente esverdeadas) tiveram germinação lenta e favoreceu a incidência de fungos (Figuras 3b e 3f) ao passo que sementes com clorofila retida em 50 % e 75 % da área da semente, consideradas parcialmente e totalmente esverdeadas, respectivamente, tiveram maiores valores de fluorescência de clorofila e resultaram em plântulas anormais (Figuras 3c e 3g) ou aumento da mortalidade das sementes (Figuras 3d e 3h).

Figura 3. Sementes de soja com níveis crescentes de clorofila retida, obtidas com imagens RGB (Red-Green-Blue), de morfologia interna com as mesmas sementes observada em radiografia e sinais da fluorescência de clorofila detectado por imagens multiespectrais a 660 nm (*Chl* 660 nm) e 730 nm (*Chl* 730 nm), respectivamente. Nas imagens multiespectrais das sementes de soja, transformadas em mapa de cores com base em níveis de cinza, os tons de cores azul escuro (660 nm, do VideometerLab) e preto (730 nm, do SeedReporter) representam as sementes com tegumento e embrião “amarelos”, cuja clorofila foi degradada e, por isso, apresentam baixos sinais da fluorescência de clorofila; as tonalidades com tendência ao vermelho intenso, indicam as sementes “esverdeadas”, cuja clorofila está retida no tegumento e embrião e, portanto, expressam maiores sinais da fluorescência de clorofila. **a; e:** plântula normal de soja resultante de semente amarela; **b; f:** semente morta, com dano mecânico, coberta por micélio fúngico e sinais fracos da fluorescência de clorofila; **c; g:** plântula de soja anormal originada de semente com retenção parcial de clorofila; **d; h:** semente morta resultante do esverdeamento, que indica alto índice de clorofila retida.

A técnica de análise de imagens multiespectrais para detecção e quantificação da FC em associação com os testes de germinação, de vigor e de viabilidade confirmaram que a proporção de sementes esverdeadas de soja comprometeu o potencial fisiológico das sementes. Esses resultados estão de acordo com os relatos de Jalink et al (1998), Dell' Aquila et al. (2002), Kenanoglu et al. (2013), Yadav et al. (2015), Cícero et al. (2009) e Teixeira et al. (2020) que observaram relação entre a FC com a germinação e o vigor de sementes de *Brassica oleracea*, repolho branco, pimentão e *Brassica oleracea* var. capitata e soja, respectivamente, de modo que quanto maior a FC das sementes, menores são a germinação e o vigor das sementes.

A ausência de redução significativa da germinação, do vigor avaliado pela condutividade elétrica e da viabilidade aferida no teste de tetrazólio, para o cultivar Desafio 8473 RSF, e do vigor avaliado pelo envelhecimento acelerado e pelo Vigor-S, além da viabilidade pelo teste de tetrazólio, para o cultivar 96R10 IPRO, pode ter relação com o fato das sementes de soja utilizadas terem sido armazenadas em condições controladas e por pouco tempo. De acordo com Pádua et al. (2007), Cicero et al. (2009) e Kenanoglu et al. (2013), a redução da qualidade e longevidade das sementes de soja é mais acentuada em sementes armazenadas em condições não controladas, cujos efeitos negativos são mais expressivos nas sementes imaturas e esverdeadas.

O comportamento do vigor e da viabilidade das sementes de soja no teste de tetrazólio, apesar de não significativos, foram semelhantes aos resultados descritos por Zorato et al. (2007), Arruda et al. (2016) e Teixeira et al. (2020). De modo geral, o aumento proporcional de sementes esverdeada de soja nas amostras resultou em maior taxa de sementes mortas (danos por umidade) e declínio acentuado do vigor e da viabilidade. Essa manifestação é passível de ocorrer, principalmente, a partir de amostras com mais de 10 % de sementes esverdeadas e cujo esverdeamento se concentra no eixo embrionário (COSTA et al., 2001).

Com os resultados do índice de vigor aferido pelo Vigor-S, ficou evidenciada a capacidade da referida técnica em distinguir o nível de vigor, nos dois cultivares em estudo, em função dos percentuais de sementes esverdeadas de soja, corroborando com os trabalhos de Castan et al. (2018), Medeiros et al. (2019) e Rodrigues et al. (2020), os quais evidenciaram a eficiência do Vigor-S na avaliação do vigor de sementes de milho, de feijão e de soja, respectivamente.

A redução da qualidade das sementes em função da maior quantidade de clorofila retida é uma característica intrínseca das sementes esverdeadas, as quais apresentam índices elevados de deterioração, baixa capacidade de reorganização do sistema de membranas e do tecido de reserva comprometido, que favorecem a incidência de microrganismos patogênicos (FORTI et

al., 2015; PARDO et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020). Em geral, as sementes de cores características de cada cultivar de soja (sementes amarelas) apresentam baixos teores totais de clorofila, uma vez que esta clorofila foi degradada nas fases de maturação e secagem; portanto, espera-se que quanto maior a proporção destas sementes em um lote, maior será a qualidade fisiológica das sementes e o vigor das plantas (OLASOJI et al., 2012).

Embora os cultivares de soja utilizados no presente trabalho tenham apresentado germinação dentro do padrão exigido para comercialização (mínimo de 80 %), com exceção dos tratamentos com 12 % e 14 % de sementes esverdeadas do cultivar 96R10 IPRO que apresentaram 77 % de germinação, não foi observado potencial fisiológico elevado para os tratamentos com mais de 4% de sementes esverdeadas. Esses resultados estão de acordo com o que a literatura evidencia, que amostras com 5 a 10 % de sementes esverdeadas representam efeitos negativos, mas aceitáveis, sobre a qualidade fisiológica das sementes, e acima de 10 % o potencial fisiológico das sementes de soja é expressivamente comprometido, inviabilizando a comercialização desses lotes de sementes e sua utilização para semeadura (PÁDUA et al., 2007; FRANÇA-NETO et al., 2012).

A FC das sementes de soja variou conforme o porcentual de sementes esverdeadas e da intensidade da cor verde no tegumento e no embrião, independentemente do cultivar analisado. Amostras com tais características apresentaram maiores FC, o que corresponde à teores proporcionais de clorofila total ($a + b$). Como neste trabalho, a precisão da análise da FC foi verificada em sementes de espinafre (OLESEN et al., 2011), quatro cultivares de *Capsicum annuum* (KENANOGLU et al., 2013), arroz (HAY et al., 2015) e tomate (LI et al., 2016). Por outro lado, relata-se que entre certos cultivares da mesma espécie, como *Brassica napus*, a FC varia muito com o teor de clorofila e o revestimento da semente (ZHANG; GUSTA, 2010) e para outras espécies cuja clorofila é baixa ou inativa, como o milho (*Zea mays*) e o girassol (*Helianthus annuus*), a técnica não detecta a FC (KENANOGLU et al., 2013).

Assim como Costa et al. (2001), Pádua et al. (2007) e Rangel et al. (2011) os quais observaram que o aumento porcentual de sementes esverdeadas em lotes de sementes amarelas de soja tinha correlação inversa com as variáveis da qualidade fisiológica das sementes, no presente trabalho foi possível relacionar diretamente os níveis de sementes esverdeadas com a FC e, em contra-partida, a relação inversa da FC com o potencial fisiológico das sementes, conforme as análises dos componentes principais e matrizes de correlações. Resultados semelhantes foram evidenciados para sementes de repolho (JALINK e al., 1998), espinafre (DELEURAN et al., 2013), pimentas (KENALOGLU et al., 2013), arroz (COSTA et al., 2014) e soja (CÍCERO et al., 2009; FORTI et al., 2015). A possível justificativa para esses resultados

decorre da sensibilidade do método de detecção e análise da FC das sementes, que amplifica os sinais da FC das sementes e a intensidade desses sinais indicam alterações nos metabólitos das sementes, resultantes de estresses bióticos e abióticos. Diante do exposto, a técnica de análise de imagens espectrais torna-se viável na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de distintas espécies (MATZRAFI et al., 2017).

2.4 Conclusões

A análise de imagens multiespectrais permitiu a identificação precisa das sementes esverdeadas e a quantificação de sua fluorescência de clorofila. As sementes esverdeadas de soja dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO apresentaram índices de fluorescências de clorofila maiores do que 40 pontos (na banda espectral de 660 nm) e maior do que 5.000 pontos (na banda espectral de 730 nm). Foi demonstrada a correlação negativa entre a incidência de sementes esverdeadas de soja e a sua qualidade fisiológica, de modo que níveis acima de 4 % de sementes esverdeadas nas amostras significa perdas acentuadas no potencial fisiológico. Portanto, a fluorescência de clorofila detectada por intermédio de imagens multiespectrais tem relação inversa com o potencial fisiológico de sementes de soja.

Referências

- ARRUDA, M. H. M.; MENEGHELLO, G. E.; VIEIRA, J. F.; GADOTTI, G. I. Qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja com diferentes percentuais de sementes esverdeadas. **Magistra**, v.28, p.194-200, 2016.
- BORDIGNON, B. C. S.; VEIGA, V. V.; BIANCHINI, F.; SHIMOIA, E. P. Percentual de sementes esverdeadas e sua influência na qualidade fisiológica de doze cultivares de soja. **Perspectiva**, v.41, n.155, p.25-33, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BRASIL. **Painel Brasileiro de Sementes: SIGEF - Controle da Produção de Sementes e Mudanças** - Indicadores. 2021. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasília, 2020. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/sigefsementes/index.htm>>. Acesso em: 16 de agosto de 2020.
- CAIRES, A. R. L.; SCHERER, M. D.; SANTOS, T. S. B.; PONTIM, B. C. A.; GAVASSONI, W. L.; OLIVEIRA S. L. Water stress response of conventional and transgenic soybean

- plants monitored by chlorophyll a fluorescence. **Journal of Fluorescence**, v.20, p.645–649, 2010.
- CARVALHO, C.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; TREICHEL, M. **Anuário Brasileiro de Sementes**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 56p.
- CASTAN, D. O. C., GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v.75, p.167-172, 2018.
- CICERO, S. M.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Use of chlorophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.145-151, 2009.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento: **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: safra 2020/21. Brasília: Conab, v.8, n.11, 2021.
- COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.102-107, 2001.
- COSTA, D. S.; KODDE, J.; GROOT, S. P. C. Chlorophyll fluorescence and X-ray analyses to characterize and improve paddy rice seed quality. **Seed Science and Technology**, v.42, p.449-453, 2014.
- CRUZ-CASTILLO, J. G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B. R.; LAWES, G. S.; LAWOKO, C. R. O.; WOOLLEY, D. J. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. **HortScience**, v.29, p.1115–1119, 1994.
- DELL'AQUILA, A.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Application of chlorophyll fluorescence in sorting controlled deteriorated white cabbage seeds. **Seed Science and Technology**, v.30, p.689–695, 2002.
- DELEURAN, L. C.; OLESEN, M. H.; BOELT, B. Spinach seed quality: potential for combining seed size grading and chlorophyll fluorescence sorting. **Seed Science Research**, v.23, p.271-278, 2013.
- ELMASRY, G.; MANDOUR, N.; AL-REJAIE, S.; BELIN, E.; ROUSSEAU, D. Recent applications of multispectral imaging in seed phenotyping and quality monitoring: an overview. **Sensors**, v.19, n. 5, p.1090-1122, 2019.
- FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; INOMOTO, M. M.; SLIWINSKA, E.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. *Meloidogyne javanica* infection of soybean plants: plant response, seed quality and green seeds occurrence. **Seed Science and Technology**, v.43, p.1-12, 2015.

- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tretrazólio**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 108p.
- FRANÇA-NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M.; HENNING, A. A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico – série sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 16p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 91).
- FRANÇA-SILVA, F.; REGO, C. H. Q.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MORAES, M. H. D.; MEDEIROS, A. D.; SILVA, C. B. Detection of *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif [*Helminthosporium avenae* (Eidam)] in black oat seeds (*Avena strigosa* Schreb) using multispectral imaging. **Sensors**, v.20, n.12, p.1-10, 2020.
- HAY, F. R.; TIMPLE, S.; DUIJN, B. V. Can chlorophyll fluorescence be used to determine the optimal time to harvest rice seeds for long-term genebank storage? **Seed Science Research**, v.25, p.321–334, 2015.
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; FRANDAS, A.; VAN PIJLEN, J. G. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, v.8, p.437-443, 1998.
- KENANOGLU, B. B.; DEMIR, I.; JALINK, H. Chlorophyll Fluorescence sorting method to improve quality of *Capsicum* Pepper seed lots produced from different maturity fruits. **HortScience**, v.48, p.965-968, 2013.
- LI, C.; WANG, X.; MENG, Z. Tomato seeds maturity detection system based on chlorophyll fluorescence. **Optical Design and Testing VII**, v.10021, p.1-7, 2016.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2.ed. Londrina: ABRATES, 2015.
- MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.185-246, 2020.
- MATZRAFI, M.; HERRMANN, I.; NANSEN, C.; KLIPER, T.; ZAIT, Y.; IGNAT, T.; SISO, D.; RUBIN, B.; KARNIELI, A.; EIZENBERG, H. Hyperspectral technologies for assessing seed germination and trifloxysulfuron-methyl response in *amaranthus palmeri* (*Palmer Amaranth*). **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.474, 2017.
- MEDEIROS, A. D.; SILVA, L. J.; CAPOBIANGO, N. P.; FIALHO, C. A.; DIAS, D. C. F. S. Assessing the physiological quality of common bean seeds using the Vigor-S[®] system and its relation to the accelerated aging test. **Journal of Seed Science**, v.41, p.187-195, 2019.

- MO, C.; KIM, L. S.; KIM, G.; CHEONG, E. J.; YANG, J.; LIM, J. Detecting drought stress in soybean plants using hyperspectral fluorescence imaging. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 40, n. 4, p. 335-344, 2015.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p.49-85.
- NI, Z.; LU, Q.; HUO, H.; ZHANG, H. Estimation of chlorophyll fluorescence at different scales: a review. **Sensors**, v.19, n.13, p.3000-3022, 2019.
- OLASOJI, J. O.; ALUKO, A. O.; ADENIYAN, O. N.; OLANIPEKUN, S. O.; OLOSUNDE, A. A.; OKOH, J. O. Effect of time of harvest on physiological maturity and kenaf (*Hibiscus cannabinus*) seed quality. **African Journal of Plant Science**, v.6, p.282–289, 2012.
- OLESEN, M. H.; CARSTENSEN, J. M.; BOELT, B. Multispectral imaging as a potential tool for seed health testing of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Seed Science and Technology**, v.39, p.140-150, 2011.
- PÁDUA G. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; CARVALHO, M. L. M.; COSTA, O.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.112–20, 2007.
- PARDO, F. F.; BINOTTI, F. F. S.; CARDOSO, E. D.; COSTA, E. Qualidade fisiológica de sementes de soja esverdeadas em diferentes tamanhos. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.2, n.3, p.39–43, 2015.
- RANGEL, M. A. S.; MINUZZI, A.; PIÉREZAN, L., TEODÓSIO, T. K. C.; ONO, F. B.; CARDOSO, P. C. Presença e qualidade de semente esverdeadas de soja na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.33, n.1, p.127-132, 2011.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, v.55, p.275-286, 2019.
- RODRIGUES, M.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S: System for automated analysis of soybean seed vigor. **Journal of Seed Science**, v.42, e202042039, 2020.
- SMANIOTTO, T. A. S.; RESENDE, O.; MARÇAL, K. A. F.; OLIVEIRA, D. E.C.; SIMON, G. A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.4, p.446-453, 2014.

- TEIXEIRA, S. B.; SILVA, J. G.; MENEGUZZO, M. R.; MARTINS, A. B.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. Green soybean seeds: effect on physiological quality. **Ciência Rural**, v.50, e20180631, 2020.
- VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.333-388, 2020.
- YADAV, S. K.; JALINK, H.; GROOT, S. P. C.; VAN DER SCHOOR, R. YADAV, S.; MADLANI, M.; KODDLE, J. Quality improvement of aged cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) seeds using chlorophyll fluorescence sensor. **Scientia Horticulturae**, v.189, p.81–85, 2015.
- ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA-NETO, J. B. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.11-19, 2007.

3 ANÁLISE DE IMAGENS MULTIESPECTRAIS NA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS DE SOJA ORIUNDAS DE SEMENTES ESVERDEADAS

Resumo

A retenção de clorofila nas sementes da soja é uma desordem fisiológica decorrente de estresses bióticos e abióticos, que ocasionam reduções na emergência de plântulas e no vigor das plântulas e das plantas formadas. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o uso de imagens multiespectrais de fluorescência de clorofila combinadas com testes de vigor para detectar os efeitos da retenção de clorofila no desempenho de sementes, plântulas e plantas. Imagens radiográficas e de fluorescência de clorofila de amostras de sementes de soja, com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO, foram obtidas com dois equipamentos multiespectrais, operando com espectros de 660 nm e 730 nm. Posteriormente, as sementes de cada tratamento foram submetidas aos testes de emergência de plântulas e de velocidade de emergência de plântulas, comprimento de plantas aos 20 dias após semeadura e determinação das fluorescências inicial (F_0), máxima (F_m) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada tratamento. A partir do *software R*[®], os dados de vigor e de FC das sementes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) foram calculados para todas as combinações entre as avaliações com significância dos valores r , determinados pelo teste t ($p \leq 0,05$). Para ambos os cultivares, os resultados indicam que: a fluorescência de clorofila é proporcional ao percentual de sementes esverdeadas, sendo que níveis acima de 10 % representam declínio acentuado na emergência e na velocidade de emergência de plântulas; o comprimento da parte aérea das plantas de soja não representou um parâmetro confiável para evidenciar diferenças em relação à proporção de sementes esverdeadas; as fluorescências inicial (F_0), máxima (F_m) e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) são indicadores de possíveis danos ocorrendo no aparato fotossintético causado pela retenção de clorofila nas sementes e se correlacionaram inversamente com o vigor das plântulas e plantas de soja. Portanto, a técnica de análise de imagens multiespectrais de fluorescência de clorofila possibilita relacionar a retenção de clorofila nas sementes de soja com os danos nos centros de reação do fotossistema II que culminaram no declínio do vigor das plântulas e plantas avaliadas.

Palavras-chave: Aparato fotossintético; Clorofila *a*; Fotossistema II; Fluorescência de clorofila; *Glycine max* L. Merrill.

ANALYSIS OF MULTISPECTRA IMAGES IN THE EVALUATION OF PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY OF SOYBEAN PLANTS FROM GREEN SEEDS

Abstract

Chlorophyll retention in soybean seeds is a physiological disorder resulted from biotic and abiotic stresses, which reduces the emergence of seedlings and the vigor of seedlings and formed plants. Thus, the objective of this work was to evaluate the use of multispectral chlorophyll fluorescence images combined with vigor tests to detect the effects of chlorophyll retention on the performance of seeds, seedlings and plants. Radiographic and fluorescence

images of chlorophyll from soybean seed samples, with 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % and 14 % of green seeds, of cultivars Desafio 8473 RSF and 96R10 IPRO, were obtained with two multispectral equipment, operating with 660 nm and 730 nm spectra. Subsequently, seeds of each treatment were subjected to seedling emergence and seedling emergence speed tests, plant length at 20 days after sowing and determination of initial (F_0), maximum (F_m) and potential quantum yield of the photosystem II (F_v / F_m). A completely randomized design was used, with four replicates of each treatment. Using R[®] software, the vigor and CF data of seeds were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means grouped by the Skott-Knott test ($p \leq 0.05$). Pearson's linear correlation coefficients (r) were calculated for all combinations among evaluations with significance of the r values, determined by the t test ($p \leq 0.05$). For both cultivars, the results indicate that: chlorophyll fluorescence is proportional to the percentage of green seeds, with levels above 10 % representing a sharp decline in seedling emergence and emergence seedling speed; the length of aerial part of soybean plants did not represent a reliable parameter to show differences in relation to the proportion of green seeds; the initial (F_0), maximum (F_m) and maximum quantum yield of photosystem II (F_v / F_m) are indicators of possible damage occurring in the photosynthetic apparatus caused by the retention of chlorophyll in seeds and were inversely correlated with the vigor of soybean seedlings and plants. Therefore, the analysis of multispectral chlorophyll fluorescence images technique makes it possible to relate the retention of chlorophyll in soybean seeds with the damage in the reaction centers of photosystem II that culminated in the decline of the evaluated seedlings and plants vigor.

Keywords: Photosynthetic apparatus; Chlorophyll *a*; Photosystem II; Chlorophyll fluorescence; *Glycine max* L. Merrill.

3.1 Introdução

A cultura da soja é indispensável para a sustentabilidade econômica de países como o Brasil, Estados Unidos, Argentina, China, Índia e Paraguai, por exemplo, cuja produção mundial na safra 2019/2020 foi de 337,30 milhões de toneladas, colhida em 122,65 milhões de hectares (USDA, 2020). O crescimento da produção e da área cultivada com a soja decorre de sua importância como fonte de nutrientes, de onde provém 40 % de proteína, 20 % de lipídios ricos em ácidos graxos insaturados e outros componentes essenciais que tornam a oleaginosa uma matéria prima para a alimentação humana e animal, além de alternativa energética para a produção de biocombustíveis (NOWAK, 2011; GAWĘDA et al., 2020).

Em regiões de clima tropical quente, como no Brasil, durante a maturação, a ocorrência de temperaturas acima de 30 °C associada à déficit hídrico, ataque de percevejos e ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), induzem à maturação forçada e prematura das sementes de soja, com efeitos diretos na inibição das enzimas responsáveis por degradar a clorofila das sementes, cujo reflexo é a retenção permanente da clorofila no tegumento e no embrião das sementes que se apresentam com coloração verde permanente (ZORATO et al., 2007a; FRANÇA-NETO et al., 2012; ARRUDA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020).

Como as sementes esverdeadas são, geralmente, de menor diâmetro, maior enrugamento e deformação e apresentam espécies reativas de oxigênio (EROs) que resultam em deterioração acentuada, consequentemente apresentam baixas germinação e vigor, alta anormalidade de plântulas e as plântulas e plantas originadas são de baixo desenvolvimento radicular e baixa produtividade (FRANÇA-NETO et al., 2012; PARDO et al. 2015; TEIXEIRA et al., 2016).

Embora a clorofila retida nas sementes de soja condicione maior índice ROS nos tecidos de reserva que limita o crescimento do eixo embrionário e a formação de plantas vigorosas no campo (TEIXEIRA et al., 2020), pouco se sabe sobre a integridade do aparato fotossintético das plantas oriundas das sementes esverdeadas. É possível que as plantas formadas a partir de sementes esverdeadas apresentem capacidade fotossintética limitada ou fotossistemas inativos, pois esses materiais; além de apresentarem concentração irregular de pigmentos cloroplastídicos, contam com espécies reativas de oxigênio que comprometem a permeabilidade de membranas e causam desordem no transporte de elétrons e inativação de enzimas e proteínas (RISTIC et al., 2007; ASHRAF; HARRIS, 2013; MATHUR et al., 2014).

Existem métodos não invasivos baseados na absorbância e, ou reflectância da radiação em comprimentos de onda específicos, por folhas intactas, que possibilitam a avaliação dos estresses sobre o efeito fotoinibitório da fotossíntese e que resulta em danos ao fotossistema II, que trata-se da fluorescência inicial ou mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (diferença entre a F_m e a F_0) e do rendimento quântico máximo ou potencial do fotossistema II (F_v/F_m), que possibilita o diagnóstico do aparato fotossintético das plantas em resposta a um determinado estresse (RÊGO; POSSAMAI, 2004).

A técnica de análise de fluorescência de clorofila é não destrutiva e é utilizada para investigar a reação fisiológica do fotossistema II de plantas de distintas espécies, conforme demonstraram Bauriegel et al. (2011) após a análise de folhas e espigas de trigo, Yendrek et al. (2017) ao determinarem a eficiência fotossintética, distribuição e variação da fluorescência de clorofila em folhas de diferentes genótipos de milho e, também, Li et al. (2018) quando detectaram a ocorrência de estresse por herbicida em plantas de soja. Nestes estudos a observação de índices de F_v/F_m inferior a 0,75 foram indicativos da ocorrência de estresse.

Considerando que o uso de imagens multiespectrais para detecção de fluorescência de clorofila em plantas de soja é sensível à identificação de estresses abiótico e biótico e que a fluorescência da clorofila permite avaliar o desempenho e a capacidade fotossintética, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes percentuais de sementes esverdeadas de soja no vigor e no rendimento do fotossistema II das plântulas e plantas, analisadas por meio de imagens multiespectrais.

3.2 Material e Métodos

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba SP.

Foram utilizadas sementes de soja, dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO, provenientes, respectivamente, das empresas Atto Sementes, localizada em Rondonópolis (MT) e Corteva Agriscience, localizada em Planaltina (DF), produzidas no ano agrícola de 2018/2019. As sementes foram armazenadas em câmara fria e seca (10 °C e 30 % de umidade relativa do ar) até a realização do experimento. Como os lotes dos dois cultivares mesclavam sementes esverdeadas e amarelas, as sementes com quaisquer tonalidades da cor verde foram separadas de forma visual e manual, sob lupa de seis aumentos (6x).

Para a realização dos testes de qualidade das sementes [emergência e velocidade de emergência de plântulas, rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) e comprimento de plantas] foram utilizados para cada teste oito tratamentos que corresponderam à mistura de sementes esverdeadas com as sementes amarelas (sem sinais de esverdeamento) nas proporções de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, em função da massa de sementes. Antes de cada teste, as sementes foram radiografadas e, em seguida, submetidas à detecção e quantificação da fluorescência de clorofila em dois equipamentos multiespectrais (VideometerLabTM e SeedReporterTM), conforme metodologias descritas a seguir.

Teste de raios X: foi realizado com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, onde as sementes de cada repetição foram identificadas e dispostas uma a uma, equidistante uma da outra, em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro. Em seguida, cada placa foi colocada individualmente dentro do aparelho de raios X digital, modelo Faxitron[®] MultiFocus (Faxitron Bioptics LLC, USA), distanciadas a 20 cm da fonte de emissão de radiação e radiografadas a 25 kV com exposição de 15 segundos. As imagens radiográficas digitais foram obtidas, salvas em HD externo, avaliadas quanto a presença de danos mecânicos, por “umidade” e por percevejos e substituição dessas sementes por outras sem danos, de modo a minimizar a interferências destas no potencial fisiológico e isolar o efeito do esverdeamento. Em sequência, as sementes foram submetidas à detecção da fluorescência de clorofila por técnicas multiespectrais.

Detecção e quantificação da fluorescência de clorofila com VideometerLab: antes de proceder às capturas das imagens multiespectrais, o VideometerLab4™ (Videometer A/S, Herlev, Denmark) foi calibrado quanto a intensidade de luz e correspondências de pixels, usando um alvo branco, seguido de outro alvo escuro uniforme e, finalmente, calibrado com um alvo geométrico. Para cada teste destinado à avaliação da qualidade das sementes, as placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro com as sementes, radiografadas na etapa anterior, foram individualmente posicionadas sob a esfera de integração do VideometerLab4™, composto por 19 diodos emissores de luz (LEDs variando de 365 nm a 970 nm) contíguos, que após pulsos sucessivos permitiu a excitação das moléculas de clorofila a 630 nm, 645 nm e 660 nm e emissão dos sinais de FC das sementes a 700 nm, cujos registros ocorreram pelo chip padrão de carga acoplada monocromática (CCD) e foram geradas 25 imagens de resolução 2192×2192 pixels. Após aquisição das imagens, foi identificada em cada uma as regiões de interesse (ROIs), que eram as sementes de soja, e separou-as do plano de fundo utilizando máscara ‘background’ do *software* VideometerLab™. Utilizando a banda de 660 nm, identificou-se diferenças espectrais entre a semente esverdeada e a amarela e utilizou-se o método supervisionado nCDA (Análise Discriminante Canônica Normalizada) para a transformação de imagens multiespectrais, de modo a minimizar ou maximizar as observações dentro e entre as amostras de sementes (FRANÇA-SILVA et al., 2020). Com auxílio do “blob” (Objeto Binário Rotulado) foram extraídas as reflectâncias da FC das sementes na banda de 660 nm, e os dados foram exportados para o Excel e submetidos à análise estatística para o relacionamento com o potencial fisiológico das sementes.

Detecção e quantificação da fluorescência de clorofila com SeedReporter: para cada teste destinado à avaliação da qualidade das sementes, as sementes de cada repetição por tratamento utilizadas nas fases anteriores foram retiradas das placas de petri e transferidas para placas de acrílico, retangulares, de cor preta fosco para evitar interferência no contraste das imagens e com capacidade para 100 sementes. As sementes foram posicionadas e numeradas na mesma ordem em que estavam nas imagens de raios X e do VideometerLab. Em seguida, cada placa contendo as sementes foi conduzida para o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation B.V., Wageningen, Netherlands) que ao emitir subpulsos dos LEDs, na faixa de 620 nm, de forma síncrona excitaram as clorofilas e, por meio da rápida repetição da taxa fluorimétrica (FRRF) da duração dos impulsos e filtro de emissão de FC na banda de 730 nm, registrou-se imagens na escala de cinza, com resolução de 2448×2448 pixels. Com o auxílio do *Software* CFTI – *Analisisys* (versão 5.5.1), para não comprometer o cálculo da FC, cada

imagem com as sementes foi submetida à aplicação de filtro para isolar e analisar as regiões de interesse (ROIs), que eram as sementes de soja, e extraiu-se os índices da reflectância da FC das sementes na banda de 730 nm. Os dados foram exportados para o Excel e submetidos à análise estatística. As sementes foram retiradas das placas de acrílico, transferidas para bandejas de plástico com células individuais, mantendo a mesma ordem de numeração e submetidas aos respectivos testes, discriminados a seguir.

Emergência e velocidade de emergência de plântulas: foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento de cada cultivar, previamente analisadas quanto à FC, distribuídas sobre uma camada de 6 cm de areia de textura média, em caixas de plástico de poliestireno (45 x 30 x 10 cm) de cor branca. Após semeadura, as sementes foram cobertas com 3 cm de areia e, posteriormente, foi realizada a irrigação até que se atingisse 60 % da capacidade de retenção do substrato. Determinou-se o índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas a partir da contagem diária do número de plântulas emersas durante 14 dias (MAGUIRE, 1962). Aos 14 dias foi calculada a porcentagem de plântulas normais emersas. Foram consideradas “plântulas emersas” aquelas que apresentaram os cotilédones acima da superfície do substrato (COSTA; MARCHEZAN, 1982).

Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m): as 50 sementes de cada repetição dos oito tratamentos de cada cultivar, previamente analisadas quanto a FC, foram semeadas a 0,03 m de profundidade, em bandejas de plástico de poliestireno (34,9 x 28,9 x 7,5 cm) de cor branca, preenchidas com 3 L de substrato constituído por uma mistura de areia e terra (proporção de 3:1), sem adubação e com manutenção do teor de água no substrato (60 % da capacidade de retenção) a cada dois dias. As bandejas com as sementes de soja foram colocadas em câmara climatizada (25 °C e UR 80 %) com fotoperíodo de 12 h de luz. Quando a planta alcançou os estádios fenológicos vegetativos VC (cotilédones completamente abertos e expandidos), V1 (folhas unifolioladas completamente desenvolvidas) e V2 (primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida), as bandejas foram acondicionadas em sala climatizada (25 °C) sem presença de luz, durante 30 minutos e, em seguida, foram transferidas para o interior da cabine do SeedReporter™ (PhenoVation B.V., Wageningen, Netherlands). Após acionamento de subpulsos saturantes de luzes LED UV, azul, verde, vermelho e infravermelho, as moléculas de clorofila *a* foram excitadas à 620 nm, gerando o primeiro pulso (fluorescência inicial ou mínima - F_0), conduzindo a fluorescência máxima (F_m) e a um rendimento fotoquímico do fotossistema II da fotossíntese (FSII). Durante cada impulso dos

LEDs foram captadas com filtro de emissão na banda de 730 nm imagens na escala de cinza, com 2448 x 2448 pixels, de forma síncrona. Utilizando o software de análise *Data analysis*, versão 5.7, as imagens foram processadas e com *background* foi identificadas as regiões de interesse (ROIs), que eram as plântulas e plantas de soja, e separou-as do plano de fundo (ruídos). Com auxílio da técnica “*ROI*” (Regiões de Interesse) foram extraídos a partir das imagens das plântulas e plantas, para cada estágio fenológico (VC, V1 e V2), os parâmetros fluorescência inicial ou mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v / F_m). Os dados foram registrados no Excel e, posteriormente, submetidos à análise estatística.

Comprimento de plantas: foi realizado após aferição do rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), aos 20 dias após a semeadura de cada tratamento de cada cultivar. Com auxílio de régua graduada (cm) e tomando-se como base para a medição o colo da planta no nível do substrato até a extremidade da parte aérea, sendo os resultados expressos em cm. planta⁻¹ (NAKAGAWA, 1999).

Delineamento experimental e análise estatística: foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento de cada cultivar (as análises foram realizadas separadamente para cada cultivar). Os dados dos testes de emergência e de velocidade de emergência de plântulas, rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), comprimento de plantas e de FC das sementes, a partir do VideometerLab e do SeedReporter, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Procedeu-se a confirmação da distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett e, em seguida, agrupou-se as médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Foram calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) para todas as combinações entre as avaliações e determinada a significância dos valores de r pelo teste t ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram feitas com auxílio do *software* R, versão 4.0.0 (R Core Team, 2019).

3.3 Resultados e Discussão

Diferenças nas médias de fluorescência de clorofila (FC) das sementes de soja a 660 nm e 730 nm, antes dos testes de vigor, foram observadas entre os tratamentos dos dois cultivares (Tabela 2). Em geral, o aumento da FC foi proporcional aos índices de sementes esverdeadas em cada tratamento, de modo que índices acima de 6 % de sementes esverdeadas foram responsáveis pelas maiores médias da FC.

Reduções no vigor das sementes foram observadas em função da presença de sementes esverdeadas. No cultivar Desafio 8473 RSF, as maiores médias de emergência (88 % a 90 %) e de índices de velocidade de emergência de plântulas (9,50 a 9,76) ocorreram nos tratamentos com 0 %, 2 % e 4 % de sementes esverdeadas; já as menores médias de emergência (81 % a 85 %) e de índices de velocidade de emergência (7,46 a 7,97) ocorreram nos tratamentos com 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas (Tabela 2).

No cultivar 96R10 IPRO, não houve diferenças nas médias de emergência de plântulas entre os tratamentos. Porém, ocorreram diferenças na velocidade de emergência de plântulas, de modo que os maiores índices (9,59, 8,38 e 8,30) ocorreram nos tratamentos com 0 %, 2 % e 4 % de sementes esverdeadas, respectivamente e os menores índices (6,88, 6,77 e 6,27) foram observados nos tratamentos com 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, respectivamente (Tabela 2).

Em relação à variável comprimento de plantas, aos 20 dias após semeadura, a presença de sementes esverdeadas em ambos os cultivares, Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO, não resultou em diferenças significativas entre os oito tratamentos. No geral, o comprimento médio mínimo e máximo das plantas foi de 18,99 cm e 21,23 cm, respectivamente, para o cultivar Desafio 8473 RSF, e de 18,72 cm e 21,94 cm, respectivamente, para o cultivar 96R10 IPRO (Tabela 2).

Para a fluorescência inicial (F_0), na tabela 2, as plantas do cultivar Desafio 8473 RSF nos tratamentos com mais de 4 % de sementes esverdeadas apresentaram os maiores índices de F_0 no estágio fenológico VC ($F_0 = 2328.95$ a 2452.25) e V1 ($F_0 = 3647.50$ a 3880.75); no estágio V2, diferenças não foram observadas entre os tratamentos. Para o cultivar 96R10 IPRO, no estágio VC, a F_0 não diferiu entre os tratamentos, ao passo que no estágio V1 somente o tratamento com 14 % de sementes esverdeadas apresentou o menor índice de F_0 (2676,50) e, no estágio V2, os tratamentos com 2 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas apresentaram os menores índices de F_0 , sendo 3570,50, 3317,25 e 3402,25, respectivamente.

Na tabela 2 observa-se que a fluorescência máxima (F_m) das plantas do cultivar Desafio 8473 RSF apresentou diferenças somente nos estádios VC e V1. No VC, enquanto as plântulas dos tratamentos com 0 %, 2 %, 8 %, 10 % e 14 % de sementes esverdeadas apresentaram os menores índices de F_m (8147,50, 8247,75, 7893,25, 8120,50 e 8076,98, respectivamente); no estágio v1 as plântulas dos tratamentos com 0 %, 2 % e 4 % de sementes esverdeadas apresentaram os maiores índices de F_m (8527,00, 8367,75 e 8451,50, respectivamente).

Em relação ao cultivar 96R10 IPRO, diferenças na F_m ocorreram somente no estágio V1, de modo que o tratamento com 14 % de sementes esverdeadas foi o único em que as plantas apresentaram os menores índices de F_m (10470,50), cujo efeito se deve a retenção de clorofila nas sementes e a limitação da síntese e transferência de fotossintatos das sementes para as plântulas e plantas.

Diferenças no rendimento quântico do fotossistema II (F_v / F_m) das plantas do cultivar Desafio 8473 RSF foram observadas nos estádios fenológicos VC e V2 (Tabela 2). As plântulas e plantas dos tratamentos com mais de 4 % de sementes esverdeadas apresentaram índices de F_v / F_m inferior a 0,714 no estágio VC e índices de F_v / F_m abaixo de 0,757 no estágio V2, indicando estresse decorrente da retenção de clorofila nas sementes.

O cultivar 96R10 IPRO não apresentou índices significativos de F_v / F_m nos estádios VC e V1, ao passo que nos tratamentos avaliados no estágio V2 as plantas do tratamento com 6 % de sementes esverdeadas apresentaram a menor eficiência fotoquímica do fotossistema II ($F_v / F_m = 0,725$) e os demais tratamentos apresentaram valores de F_v / F_m variando de 0,729 a 0,744, porém sem diferenças estatísticas. Nessa situação, pelo fato de todas as plantas avaliadas apresentarem índices abaixo de 0,75 pressupõe-se que todas elas sofreram estresse, resultado da maior sensibilidade do cultivar a retenção da clorofila, limitação na síntese e transferência de fotossintatos da semente para as plântulas e plantas e, conseqüentemente, do baixo vigor das plântulas e plantas originadas das sementes esverdeadas.

As imagens de raios X e de fluorescência de clorofila das sementes, plântulas e plantas obtidas com os equipamentos multiespectrais nas bandas de 660 nm e 730 nm, em três estádios fenológicos, são ilustradas na figura 4. A reflectância da FC das sementes possibilitou identificar e distinguir as sementes amarelas das esverdeadas dos dois cultivares (Figura 4). Enquanto as sementes amarelas apresentaram sinais baixos de FC, cujas plântulas e plantas apresentaram os maiores índices de eficiência do fotossistema II e de vigor, as sementes esverdeadas apresentaram índices elevados de FC, cuja carência de fotossintátos limitados pela presença das numerosas moléculas de clorofilas refletiram na redução do vigor e da viabilidade e, conseqüentemente, expressou baixos índices na eficiência do fotossistema II ($F_v / F_m \leq 0,725$), que representam danos no aparato fotossintético.

Tabela 2. Médias de fluorescência de clorofila em sementes de soja, quantificada a 660 nm (do VideometerLab) e 730 nm (do SeedReporter) antes dos testes de emergência de plântulas (E), de velocidade de emergência de plântulas (IVE), de comprimento de plantas aos 20 dias após semeadura (CP20) e de fluorescência inicial (F_0), de fluorescência máxima (F_m) e de rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) quantificados nos estádios fenológicos VC (cotilédones completamente abertos e expandidos), V1 (unifólios completamente desenvolvidos) e V2 (primeiro trifólio desenvolvido), em função da mistura de sementes esverdeadas com sementes amarelas (sem sinais de esverdeamento).

Tratamentos	660 nm	730 nm	E	IVE	660 nm	730 nm	CP20	VC			V1			V2		
								F ₀	F _m	F _v /F _m	F ₀	F _m	F _v /F _m	F ₀	F _m	F _v /F _m
	(%)	Index	(%)	(%)	Index	cm										
Cultivar Desafio 8473 RSF																
0 %	53.71 b	2121.83 b	90.50 a	9.76 a	55.54 b	2144.68 c	20.05	2339.25 a	8147.50 b	0.736 a	3159.00 b	11678.75 b	0.731	3150.75	13121.00	0.760 a
2 %	54.23 b	2092.92 b	88.00 a	9.59 a	54.46 b	2335.63 c	18.99	2251.50 b	8247.75 b	0.724 a	3456.00 b	12568.50 b	0.728	3367.75	13942.00	0.759 a
4 %	55.09 b	2177.98 b	89.00 a	9.50 a	55.85 b	2261.69 c	19.91	2256.25 b	8527.00 a	0.732 a	3312.75 b	12364.50 b	0.734	3367.00	14152.50	0.763 a
6 %	54.95 b	2218.05 a	85.00 b	8.57 b	55.88 b	2457.20 b	20.54	2358.00 a	8367.75 a	0.714 b	3656.00 a	13128.00 a	0.724	3404.50	13887.50	0.755 b
8 %	55.95 a	2420.76 b	89.00 a	8.50 b	59.25 a	2449.35 b	21.23	2452.25 a	7893.25 b	0.686 c	3719.00 a	12857.25 a	0.714	3469.75	13930.25	0.752 b
10 %	56.25 a	2252.01 b	83.50 b	7.46 c	55.32 b	2468.80 b	19.53	2418.75 a	8120.50 b	0.699 c	3647.50 a	13145.25 a	0.725	3395.75	13930.75	0.757 b
12 %	56.81 a	2382.96 a	83.00 b	7.97 c	55.84 b	2406.67 b	20.32	2328.95 a	8451.50 a	0.709 b	3880.75 a	13586.00 a	0.717	3497.75	14106.50	0.753 b
14 %	57.78 a	2498.11 a	81.50 b	7.61 c	57.94 a	2678.00 a	21.03	2379.43 a	8076.98 b	0.711 b	3735.25 a	13500.75 a	0.725	3531.25	14411.75	0.756 b
CV (%)	2.41*	6.99*	4.97*	6.61*	2.21*	5.71*	4.30 ^{ns}	3.20*	2.65*	1.82*	6.28*	4.33*	1.35 ^{ns}	4.87 ^{ns}	4.08*	0.51*
Cultivar 96R10 IPRO																
0 %	65.70 d	2257.80 d	83.00	9.59 a	86.24 d	2204.93 d	21.14	2366.50	9752.75	0.754	3437.75 a	12784.00 a	0.733	3626.25 a	14091.50	0.733 a
2 %	65.78 d	2291.68 d	79.00	8.38 b	88.87 c	2349.21 c	19.34	2199.50	9696.75	0.769	3123.50 a	11698.75 a	0.735	3383.75 b	13329.00	0.735 a
4 %	65.43 d	2227.20 d	85.50	8.63 b	88.55 c	2396.04 c	20.23	2203.25	9739.25	0.769	3201.25 a	12060.50 a	0.736	3570.50 a	13928.25	0.736 a
6 %	67.52 c	2431.94 c	82.50	7.81 c	90.79 b	2567.44 b	21.94	2210.00	9721.25	0.767	3185.25 a	11540.75 a	0.725	3707.50 a	13942.75	0.725 b
8 %	68.82 b	2425.66 c	79.00	7.58 c	91.37 b	2594.73 b	21.12	2264.50	10014.25	0.770	3231.75 a	11988.50 a	0.732	3642.50 a	14132.75	0.732 a
10 %	68.91 b	2512.55 c	83.00	6.88 d	92.37 b	2673.78 b	21.00	2215.75	9687.25	0.767	3153.25 a	11686.50 a	0.732	3537.25 a	13828.50	0.732 a
12 %	70.55 a	2619.04 b	82.50	6.77 d	92.62 b	2670.99 b	20.16	2118.25	9439.75	0.771	3106.00 a	11410.00 a	0.729	3317.25 b	13337.25	0.729 a
14 %	71.16 a	2934.02 a	73.00	6.27 e	95.46 a	2896.11 a	18.72	1997.00	8099.50	0.743	2676.50 b	10470.50 b	0.744	3402.25 b	13353.00	0.744 a
CV	1.46*	5.04*	6.24 ^{ns}	4.83*	1.48*	4.16*	6.60 ^{ns}	6.87 ^{ns}	8.47 ^{ns}	2.22 ^{ns}	7.13*	5.00*	0.90 ^{ns}	4.98*	4.12 ^{ns}	0.61*

*, ns = significativo e não significativo pelo teste F ($p < 0,05$), respectivamente; médias seguidas de letras diferentes em cada coluna, dentro de cada cultivar, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$);

CV = coeficiente de variação;

Figura 4. Imagens RGB (Red-Green-Blue), radiográficas e multiespectrais de fluorescência da clorofila das sementes amarelas e esverdeadas de dois cultivares de soja (Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO), obtidas com espectros de 660 nm e 730 nm e das fluorescências de clorofila inicial (F_0), máxima (F_m) e do rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) de plântulas e plantas desenvolvidas a partir de sementes amarelas e esverdeadas e avaliadas nos estádios fenológicos VC, V1 e V2. O código de falsas cores representado abaixo das imagens varia de preto (valor mínimo = zero, “0”) ao vermelho (valor máximo = um, “1”) e representam os níveis de reflectância da fluorescência de clorofila ($p \leq 0,05$).

A análise de correlação entre a fluorescência de clorofila das sementes, o vigor das plantas e os parâmetros relacionados a eficiência fotossintética das plantas do cultivar Desafio 8473 RSF, em função dos percentuais de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, estão apresentados na Figura 5.

Em geral, ocorreram correlações muito fortes e positivas ($r \geq 0,73$) entre as fluorescências de clorofila, a 660 nm e 730 nm, das sementes destinadas aos testes de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência de plântulas, comprimento das plantas aos 20 dias após semeadura e as fluorescências inicial e máximas. Este resultado indica que a proporção de sementes esverdeadas em ambos os testes foi homogênea, de modo que quanto maior o índice das sementes esverdeadas na amostra, maior foi o índice de clorofila retida, resultando em sinais elevados da FC.

Correlações fortes e negativas ($r \leq -0,68$) ocorreram para as fluorescências de clorofila das sementes submetidas à emergência de plântulas, obtidos nas bandas de 660 nm e 730 nm, com os respectivos dados de emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência de plântulas, entre essas duas últimas variáveis e as fluorescências de clorofila (P_{730} , F_0 e F_m avaliados nos estádios V1 e V2) e entre as fluorescência de clorofila das sementes dos testes de vigor com o rendimento quântico do fotossistema (F_v / F_m) das plântulas e plantas avaliado nos estádios VC, V1 e V2 (Figura 5).

Essa relação inversa entre fluorescências de clorofila e vigor das plântulas e plantas decorre do fato de que uma maior retenção de clorofila nas sementes implica no aumento proporcional da formação de EROs que são responsáveis por acentuar injúrias oxidativas nos tecidos vegetais e cujos efeitos são observados diretamente no declínio do vigor das plântulas e plantas e indiretamente avaliados pelos sinais da fluorescência de clorofila.

Figura 5. Matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar Desafio 8473 RSF: fluorescências de clorofila em função de oito tratamentos, cada qual com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas. Os números na matriz mostram o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis. *, significativo ($p < 0,05$); E, emergência de plântulas; IVE, índice de velocidade de emergência de plântulas; 660 e 730, fluorescência de clorofila das sementes detectada nas bandas 660 nm e 730 nm dos equipamentos multiespectrais; CP20, comprimento de plantas aos 20 dias após semeadura; F₀, fluorescência inicial; F_m, fluorescência máxima; F_v/F_m, rendimento quântico máximo do fotossistema II; VC, V1 e V2 são os estádios fenológicos, onde VC, cotilédones completamente abertos e expandidos, V1 - folhas unifolioladas completamente desenvolvidas e V2 - primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida.

Os dados da correlação entre a fluorescência da clorofila das sementes, o vigor das plantas e os parâmetros relacionados a eficiência fotossintética das plantas do cultivar 96R10 IPRO, em função dos índices de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, estão apresentados na Figura 6.

Foram observadas correlações muito fortes e positivas ($r \geq 0,71$) entre as fluorescências de clorofila, a 660 nm e 730 nm, das sementes destinadas aos testes de emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência de plântulas, comprimento das plantas aos 20 dias após semeadura e as fluorescências inicial e máximas. Este resultado indica que a proporção de

sementes esverdeadas em ambos os testes foi homogênea e quanto maior o índice das sementes esverdeadas na amostra, maior o índice de clorofila retida, observado pelos altos sinais da FC.

Correlações fortes e negativas ($r \leq -0,71$) ocorreram para as fluorescências de clorofila das sementes, a 660 nm e 730 nm, antes do teste de emergência de plântulas com os respectivos dados de emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas, entre essa última variável e as fluorescências de clorofila das sementes submetidas à avaliação do comprimento das plantas aos 20 dias após semeadura e entre as fluorescência de clorofila das sementes submetidas à avaliação do comprimento das plantas aos 20 dias após semeadura e fluorescências mínima e máxima dos estádios VC e V1, além da relação inversa entre o rendimento quântico do fotossistema (F_v / F_m) das plântulas e plantas avaliado nos estádios V1 e V2 com as fluorescências de clorofila das sementes (Figura 6).

É provável que tais resultados descritos anteriormente estejam relacionados com a retenção de clorofila, o que implica na síntese de elevadas espécies reativas do oxigênio responsáveis por acentuar injúrias oxidativas nos tecidos vegetais e cujos efeitos são observados diretamente no declínio do vigor das plântulas e plantas e indiretamente observados pelos sinais da fluorescência de clorofila.

Figura 6. Matriz de correlação entre a qualidade fisiológica de sementes de soja, cultivar 96R10 IPRO: fluorescências de clorofila em função de oito tratamentos, cada qual com 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas. Os números na matriz mostram o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis. *, significativo ($p < 0,05$). E, emergência de plântulas; IVE, índice de velocidade de emergência de plântulas; 660 e 730, fluorescência de clorofila das sementes detectada nas bandas 660 nm e 730 nm dos equipamentos multiespectrais; CP20, comprimento de plantas aos 20 dias após semeadura; F₀, fluorescência inicial; F_m, fluorescência máxima; F_v/F_m, rendimento quântico máximo do fotossistema II; VC, V1 e V2 são os estágios fenológicos, onde VC, cotilédones completamente abertos e expandidos, V1 - folhas unifolioladas completamente desenvolvidas e V2 - primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida.

Reduções de até 10 pontos percentuais na emergência de plântulas e de 3 pontos no índice de emergência de plântulas, observadas nos dois cultivares avaliados, refletem os efeitos deletérios da presença de mais de 6 % de sementes esverdeadas no vigor das sementes. De modo similar, Zorato et al. (2007a; 2007b) observaram que, para diferentes cultivares de soja, acima de 11 % de sementes esverdeadas há redução drástica na emergência das plântulas e Teixeira et al. (2020) que observaram decréscimos acentuados na emergência de plântulas e na velocidade de emergência de plântulas, cujos lotes apresentavam mais de 8 % de sementes esverdeadas.

Em relação ao comprimento das plantas, embora sem diferenças estatísticas entre os tratamentos, houve desuniformidade no desenvolvimento das plantas oriundas de sementes com maior índice de pigmentação verde, que indica quantidade acentuada de clorofila retida nas sementes. Resultados similares foram relatados por Zorato et al. (2007a) e Teixeira et al. (2020), quando avaliaram os efeitos da presença de mais de 7 % de sementes esverdeadas sobre o vigor das sementes de soja e não observaram prejuízos no comprimento da parte aérea das plantas, sendo apenas observada redução no comprimento das raízes, resultando em redução em até 10 cm no comprimento total das plantas provenientes de sementes esverdeadas.

A redução da emergência de plântulas, da velocidade de emergência de plântulas e da desuniformidade no desenvolvimento aéreo das plantas, foi inversamente proporcional à presença de mais de 6 % de sementes esverdeadas nos dois cultivares e embora não existam precedentes na literatura acerca do efeito da retenção de clorofila nas sementes de soja sobre o desenvolvimento de plantas até o estágio V2, se presume que a clorofila retida nas sementes tenham elevado a concentração de lipídios nos tecidos de reserva e embrião, reduzindo ou cessando a translocação de fotossintatos para a formação das plântulas e plantas, com prejuízos ao metabolismo fotossintético pela deterioração acentuada dos tecidos de reservas e embrião pelas reações de pirólise, hidroxilação, oxidação, fotooxidação ou feofitinização (KAGAWA et al., 1973; DAN et al., 1987; FUKUSHIMA; LANFER-MARQUEZ, 2000).

A eficiência do fotossistema das plântulas e das plantas de soja, aferida com os parâmetros de fluorescência de clorofila (F_0 , F_m , F_v/F_m), foi comprometida pelo percentual de sementes esverdeadas, uma vez que a clorofila retida nos cotilédones, no tegumento e no embrião da semente está relacionada à maiores índices de lixiviação de solutos cujas desordens nos sistemas de membranas celulares e no aparato fotossintético dessas plantas, culminam na redução da fotossíntese e, conseqüentemente, no desenvolvimento das plantas de soja (COSTA et al., 2001; GHASSEMI-GOLEZANI; MAZLOOMI-OSKOOYI, 2008; RANGEL et al., 2011, FRANÇA-NETO et al., 2012).

Acréscimos na fluorescência inicial (F_0) das plântulas e das plantas do cultivar Desafio 8473 RSF, nos tratamentos com mais de 4 % de sementes esverdeadas, e decréscimos na F_0 das plântulas e das plantas do cultivar 96R10 IPRO, mais críticos nos tratamentos com 12 % e 14 % de sementes esverdeadas, indicam estresse oxidativo pela retenção das clorofilas nos tecidos de reserva, no tegumento e no embrião da semente de soja, as quais podem ter danificado o centro de reações do fotossistema II e reduzido o fluxo de elétrons da antena do fotossistema II para centro de reação P680 (PSII) (DIAS e MARENCO, 2007; BAKER, 2008; LI et al., 2010; SILVA et al., 2014). Além disso, supõe-se que os valores reduzidos da F_0 observados para o

cultivar 96R10 IPRO possam ter relação com o menor número de plântulas emersas e o menor vigor das plantas no momento da avaliação, em consequência da sensibilidade deste cultivar às sementes esverdeadas.

A fluorescência máxima (F_m) que foi maior para os tratamentos com 4 %, 6 % e 12 % de sementes esverdeadas, do cultivar Desafio 8473 RSF, indica danos no fotossistema pelo bloqueio do fluxo de elétrons ou ausência de demanda na produção de NADPH ou ATP (BAKER, 2008; MATHIS e PALLOTIN, 1981) que, possivelmente, decorre da retenção de clorofila nas sementes. Por outro lado, baixo índice de F_m , o qual foi crítico para as plântulas e plantas do tratamento com 14 % de sementes esverdeadas do cultivar 96R10 IPRO, indica estresse relacionado à degradação das proteínas D1 sob ação das EROs, conduzindo a fotoinibição da quinona e inativação do PSII nas membranas dos tilacóides e, assim, limitando o fluxo de elétrons entre os fotossistemas (LI et al., 2010; SILVA et al., 2014; NELSON; MILLAR, 2015; SOUZA et al., 2020).

O declínio da eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m) nas folhas do cultivar Desafio 8473 RSF, avaliadas em VC ($F_v/F_m \leq 0.714$) e V2 ($F_v/F_m \leq 0.757$), e do cultivar 96R10 IPRO, avaliadas no estágio V2 ($F_v/F_m = 0.725$), evidenciam distúrbios no sistema fotossintético em virtude dos níveis de retenção de clorofila, mais acentuado nos tratamentos com mais de 6 % de sementes esverdeadas. Plantas consideradas sem estresse apresentam índices de F_v/F_m , acima de 0,75, indicando o uso eficiente da radiação pelo aparelho fotossintético e na assimilação de carbono, enquanto que índices abaixo de 0,75 correspondem a ocorrência de estresses fotoinibidores, como observado no presente estudo para os dois cultivares nos três estádios fenológicos; valores abaixo de 0,50 indicam danos irreversíveis no aparato fotossintético (TESTER; BACIC 2005; BAKER, 2008; LI et al., 2010; SHU et al., 2013; MEHTA et al., 2011; MELO et al., 2017).

Os resultados da correlação inversa das reduções nos valores de F_v/F_m com o aumento de F_0 e, também, da F_m , demonstram a relação destas variáveis com a ocorrência dos danos dos centros de reação de PSII ou inibição desta sob condições de estresse (SCHNETTGER et al., 1994; BRIANTAIS et al., 1998; LAZÁR, 1999). Portanto, variações no rendimento quântico máximo do PSII podem estar associadas à retenção da clorofila nos cotilédones, tegumento e eixo embrionário da semente de soja, de modo a favorecer EROs, que atuam na peroxidação do lipídio das membranas, desintegração de tilacóides e redução na concentração de clorofila foliar e, assim, inibir o desenvolvimento da plântula e da planta de soja a partir das sementes com cotilédones, tegumentos e eixos embrionários esverdeados (HASEGAWA et al., 2000; PARIDAS, DAS, 2005; MA et al., 2011; NEDJIMI, 2014).

A viabilidade de uso das imagens multiespectrais para identificar sementes esverdeadas e quantificar os sinais de fluorescência de clorofila nas sementes, plântulas e plantas dos dois cultivares de soja, além de permitir correlacionar com o vigor das sementes, está relacionada ao potencial da referida técnica em avaliar organismos vegetais de modo não invasivo e aferir facilmente as variáveis relacionadas ao desempenho fisiológico (BAKER; ROSENQVIST, 2004). A alta relação entre os sinais da FC e o número de moléculas de clorofila não degradadas em sementes (Sinnecker et al., 2002), possibilita o uso de imagens estáticas para estimar o índice total de clorofila não degradada em sementes que compõem um determinado lote, constituindo-se em excelente meio para avaliar os possíveis prejuízos causados ao potencial fisiológico das sementes.

A partir dos resultados do experimento I (Capítulo 2) e complementados pelos resultados do experimento II (Capítulo 3), foi possível determinar o grau de sensibilidade das sementes de soja dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO com a retenção de clorofila nas sementes, que caracteriza as sementes esverdeadas de soja. As sementes parcialmente e totalmente esverdeadas (com elevada retenção de clorofila no tegumento e embrião) apresentaram morte acentuada das sementes, ou germinação lenta e desuniforme ou, ainda, a formação de plântulas anormais, constatados pelos testes de germinação, de viabilidade e de vigor. Portanto, os prejuízos no potencial fisiológico das sementes de soja, num determinado lote, são mais acentuados quando da presença de mais de 4 % de sementes esverdeadas .

Ainda sobre o capítulo 2, embora o potencial fisiológico das sementes de soja tenha sido comprometido em função dos índices de sementes esverdeadas, nas condições estudadas ocorreram respostas distintas de sensibilidade entre cultivares e entre cultivares e tratamentos, de modo que em todas as amostras dos cultivares 8473 RSF e 96R10 IPRO um considerável número de sementes esverdeadas germinaram e formaram plântulas normais e potencialmente vigorosas. Contudo, a escassez de estudos quanto ao desempenho fisiológico e a eficiência do fotossistema de plântulas e plantas de soja desenvolvidas a partir de sementes esverdeadas foram as bases para a condução do experimento II, descrito no capítulo 3.

Os resultados obtidos no capítulo 3 permitiram a constatação de que mais de 6 % de sementes esverdeadas afetaram negativamente a emergência e velocidade de emergência de plântulas, bem como o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) das plântulas e plantas de soja dos cultivares 8473 RSF e 96R10 IPRO. Além disso, a associação dos resultados dos experimentos I (com as sementes de soja) e do experimento II (com as plântulas e plantas de soja) permitem inferir que nas mesmas condições, o cultivar 96R10 IPRO apresentou menor

potencial fisiológico, cuja redução está relacionada à maior sensibilidade à retenção de clorofila nas sementes e à maior proporção das sementes esverdeadas nas amostras.

Nos experimentos I e II, para os cultivares 8473 RSF e 96R10 IPRO, ocorreram variações nos índices de fluorescência de clorofila das sementes obtidos a partir das imagens multiespectrais e essa variação foi dependente do percentual de sementes esverdeadas e da intensidade da cor verde no tegumento e no embrião das sementes. Verificou-se uma relação forte e negativa entre a fluorescência de clorofila e o potencial fisiológico das sementes de soja, ou seja, quanto maior o sinal de fluorescência de clorofila, menor o percentual de plântulas normais e maior a taxa de sementes deterioradas; no experimento II, ocorreram relações altas e positivas entre a proporção de sementes esverdeadas e os sinais de fluorescência de clorofila e relações inversas entre os níveis de sementes esverdeadas e a eficiência fotossintética das plântulas e plantas, indicando estresse no aparato fotossintético e declínio do vigor das plântulas e plantas, ambos resultantes da retenção de clorofila nas sementes.

A análise de imagem multiespectral para detecção dos sinais de fluorescência de clorofila das sementes, utilizando as bandas espectrais de 660 nm e 730 nm, foi essencial para complementação dos resultados dos testes de avaliação do potencial fisiológico das sementes e da eficiência fotossintética das plântulas e plantas de soja, de modo a elucidar os efeitos negativos da ocorrência de sementes esverdeadas sobre as variáveis supracitadas. Diante do exposto, sementes esverdeadas de soja cujos índices de fluorescências de clorofila sejam maiores que 40 pontos (a 660 nm) ou maior do que 5.000 pontos (a 730 nm), e estando em níveis acima de 4 % nas amostras de sementes, devem ser eliminadas das amostras com equipamentos baseados em fluorescência de clorofila e, assim, diminuir perdas expressivas do potencial fisiológico das sementes.

3.3 Conclusões

A tecnologia de imagens multiespectrais para detecção de fluorescência de clorofila foi eficiente para detectar sementes esverdeadas de soja e avaliar a qualidade do aparato fotossintético e o vigor das plântulas e plantas. Nas amostras de sementes dos cultivares Desafio 8473 RSF e 96R10 IPRO com mais de 6 % de sementes esverdeadas, ocorreram decréscimos acentuados na emergência e na velocidade de emergência das plântulas. Os índices de fluorescência de clorofila inicial (F_0) e de fluorescência de clorofila máxima (F_m) das plântulas e plantas aumentaram ao longo dos estádios de desenvolvimento vegetativo e, por outro lado, o rendimento quântico do fotossistema II (F_v / F_m) das declinaram, o que significa que o F_v / F_m foi um bom parâmetro para indicar a ocorrência de estresse fisiológico causado

pela retenção de clorofila nas sementes de soja. Portanto, foi possível constatar com auxílio da técnica de análise de imagens multiespectrais de fluorescência de clorofila e estatísticas multivariadas a relação alta e negativa dos níveis de sementes esverdeadas de soja com danos no aparato fotossintético, que culminaram no declínio do vigor das plântulas e plantas de soja.

Referências

- ARRUDA, M. H. M.; MENEGHELLO, G. E.; VIEIRA, J. F.; GADOTTI, G. I. Qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja com diferentes percentuais de sementes esverdeadas. **Magistra**, v.28, p.194-200, 2016.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P, J.C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v.51, n.2, p.163-190, 2013.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.403, p.1607–1621, 2004.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.
- BAURIEGEL, E.; GIEBEL, A.; HERPPICH, W. B. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse the impact of *Fusarium culmorum* on the photosynthetic integrity of infected wheat ears. **Sensors**, v.11, p.3965-3779, 2011.
- BRIANTAIS, J. M.; COMIC, G.; HODGES, M. The modification of chlorophyll fluorescence of *Chlamydomonas reinhardtii* by photoinhibition and chloramphenicol addition suggests a form of photosystem II less susceptible to degradation. **FEBS Letters**, v.236, p.226–230, 1998.
- COSTA, J. A.; MARCHEZAN, E. **Características dos estádios de desenvolvimento da soja**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. 30p.
- COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.102-107, 2001.
- DAN, E. L.; MELLO, V. D. C.; WETZEL, C. T.; POPINIGIS, F.; ZONTA, E. P. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.9, n.3, p.45-55, 1987.

- DIAS, D. P.; MARENCO, R. A. Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. **Photosynthetica**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.
- FRANÇA-NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M.; HENNING, A. A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico – série sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 16p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 91).
- FRANÇA-SILVA, F. F.; REGO, C. H. Q.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MORAES, M. H. D.; MEDEIROS, A. D.; SILVA, C. B. Detection of *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif [*Helminthosporium avenae* (Eidam)] in black oat seeds (*Avena strigosa* Schreb) using multispectral imaging. **Sensors**, v.20, n.12, p.1-10, 2020.
- FUKUSHIMA, P.S.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Chlorophyll derivatives of soybean during maturation and drying conditions. **Proceedings of the Third International Soybean Processing and Utilization Conference**, p.87-88, 2000.
- GAWĘDA, D., NOWAK, A., HALINIARZ, M.; WOŹNIAK, M. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems. **International Journal of Plant Production**, v.14, p.475–485, 2020.
- GHASSEMI-GOLEZANI, K.; MAZLOOMI-OSKOOYI, R. Effect of water supply on seed quality development in common bean (*Phaseolus vulgaris* var.). **International Journal of Plant Production**, v.2, p.117-124, 2008.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology**, v.51, p.63-99, 2000.
- KAGAWA, T.; MCGREGOR, D.I.; BEEVERS, H. Development of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings. **Plant Physiology**, v.51, n.1, p.66-71, 1973.
- LAZÁR, D. Chlorophyll a fluorescence induction. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v.1412, p.1–28, 1999.
- LI, G.; WAN, S.; ZHOU, J.; YANG, Z.; QIN, P. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. **Industrial Crops and Products**, v.31, p.13-19, 2010.
- LI, H.; WANG, P.; WEBER, J. F.; GERHARDS, R. Early identification of herbicide stress in soybean (*Glycine max* L. Merrill) using chlorophyll fluorescence imaging technology. **Sensors**, v.18, p.1-13, 2018.

- MA, Q.; YUE, L. J.; ZHANG, J. L.; WU, G. Q.; BAO, A. K.; WANG, S. M. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyte xanthoxylum*. **Tree Physiology**, v.32, p.4-13, 2011.
- MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p. 176-177, 1962.
- MATHIS, P.; PAILLOTIN, G. Primaru process of photosynthesis. In: HATCH, M. D.; BOARDMAN, N.K. eds. **The biochmistry of plants**. Academic Press, p.97-161, 1981.
- MATHUR, S.; AGRAWAL, D.; JAJOO, A. Photosynthesis: Response to high temperature stress. **Journal of Photochemistry an Photobiology B: Biology**, v.137, p.116-126, 2014.
- MEHTA, P.; KRASLAVSKY, V.; BHARTI, S.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; JAJOO, A. Analysis of salt stress induced changes in Photosystem II heterogeneity by prompt fluorescence and delayed fluorescence in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.104, p.308-313, 2011.
- MELO, H. F.; SOUZA, E. R.; CUNHA, J. C. Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.21, n.4, p.232-237, 2017.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p.49-85.
- NEDJIMI, B. Effects of salinity on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in three saltbush species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.52, p.4-13, 2014.
- NELSON, C. J.; MILLAR, A. H. Protein turnover in plant biology. **Nature Plants**, v.1, p.1-7, 2015.
- NOWAK, A. Nasiona soi zwyczajnej—cenny surowiec dietetyczny i leczniczy. **Kosmos**, v.60, n.1-2, p.179-187, 2011.
- PÁDUA G. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; CARVALHO, M. L. M.; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.112-20, 2007.
- PARDO, F. F.; BINOTTI, F. F. S.; CARDOSO, E. D.; COSTA, E. Qualidade fisiológica de sementes de soja esverdeadas em diferentes tamanhos. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.2, n.3, p.39-43, 2015.
- PARIDAS, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.324-349, 2005.

- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, v.55, p.275-286, 2019.
- RANGEL, M. A. S.; MINUZZI, A.; PIÉREZAN, L.; TEODÓSIO, T. K. C.; ONO, F. B.; CARDOSO, P. C. Presença e qualidade de semente esverdeadas de soja na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.33, n.1, p.127-132, 2011.
- RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Embrapa Florestas, n.128, 2004.
- RISTIC, Z.; BUKOVNIK, U.; PRASAD, V. Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. **Crop Science**, v.47, p.2067-2073, 2007.
- SCHNETTGER, B.; CRITCHLEY, C.; SANTORE, U. J. Relationship between photo inhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: Effect of protein synthesis. **Plant Cell Environment**, v.17, p.55–64, 1994.
- SHU, S.; YUAN, L. Y.; GUO, S. R.; SUN, J.; YUAN, Y. H. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.63, p.209-216, 2013.
- SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SANTOS, C. M.; SHARMA, V. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **Journal of Agricultural Science**, v.152, n.1, p.104–118, 2014.
- SOUZA, J. L.; SANTOS, R. B.; NUNES, V. V.; TORRES, M. F. O.; CALAZANS, C. C.; OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; SILVA-MANN, R. Déficit hídrico no desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar. **Global Science and Technology**, v.13, n.1, p.196-210, 2020.
- TEIXEIRA, R. N.; LIGTERINK, W.; FRANÇA-NETO, J. B.; MILHORST, H. W. M.; SILVA, E. A. Gene expression profiling of the green seed problem in soybean. **BMC Plant Biology**, v.16, n.1, p.1-15, 2016.
- TEIXEIRA, S. B.; SILVA, J. G.; MENEGUZZO, M. R. R.; MARTINS, A. B. N.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. M. Green soybean seeds: effect on physiological quality. **Ciência Rural**, v.50, n.2, p.e20180631, 2020.
- TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology**, v.137, p.791–793, 2005.

- USDA - U.S. Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Circular Series WAP 9-20. Publicado em set. 2020. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em 30 de set. 2020.
- YENDREK, C. R.; TOMAZ, T.; MONTES, C. M.; CAO, Y.; MORSE, A. M.; BROWN, P. J.; MCINTYRE, L. M.; LEAKEY, A. D.; AINSWORTH, E. A. High-throughput phenotyping of maize leaf physiological and biochemical traits using hyperspectral reflectance. **Plant Physiology**, v.173, p.614–626, 2017.
- ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA-NETO, J. B. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.11-19, 2007a.
- ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA-NETO, J. B. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar a sua qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.1-10, 2007b.